

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los  
Alimentos



**TESIS DOCTORAL**

**Aplicación de probióticos en la población materno-infantil:  
efectos microbiológicos, inmunológicos y bioquímicos**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Javier de Andrés Leo**

**Directores**

**Esther Antonia Jiménez Quintana**

**Irene Espinosa Martos**

**Juan Miguel Rodríguez Gómez**

**Madrid, 2018**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA**  
**DE LOS ALIMENTOS**

---



**TESIS DOCTORAL**  
**APLICACIÓN DE PROBIÓTICOS EN LA**  
**POBLACIÓN MATERNO-INFANTIL:**  
**EFFECTOS MICROBIOLÓGICOS,**  
**INMUNOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS**

**Memoria para optar al grado de Doctor presentada por**

**JAVIER DE ANDRÉS LEO**

**DIRECTORES**

**ESTHER ANTONIA JIMÉNEZ QUINTANA**

**IRENE ESPINOSA MARTOS**

**JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ**

Madrid 2017







UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos

**ESTHER ANTONIA JIMÉNEZ QUINTANA**, y **JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ**, Profesora Asociada y Catedrático del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid respectivamente; e **IRENE ESPINOSA MARTOS**, Responsable de Bioestadística y Calidad de ProbiSearch S.L.U.,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Aplicación de probióticos en la población materno-infantil: efectos microbiológicos, inmunológicos y bioquímicos”, de la que es autor el Licenciado en Veterinaria y en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **Javier de Andrés Leo**, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben, y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención Internacional.

Los Directores de la Tesis Doctoral,

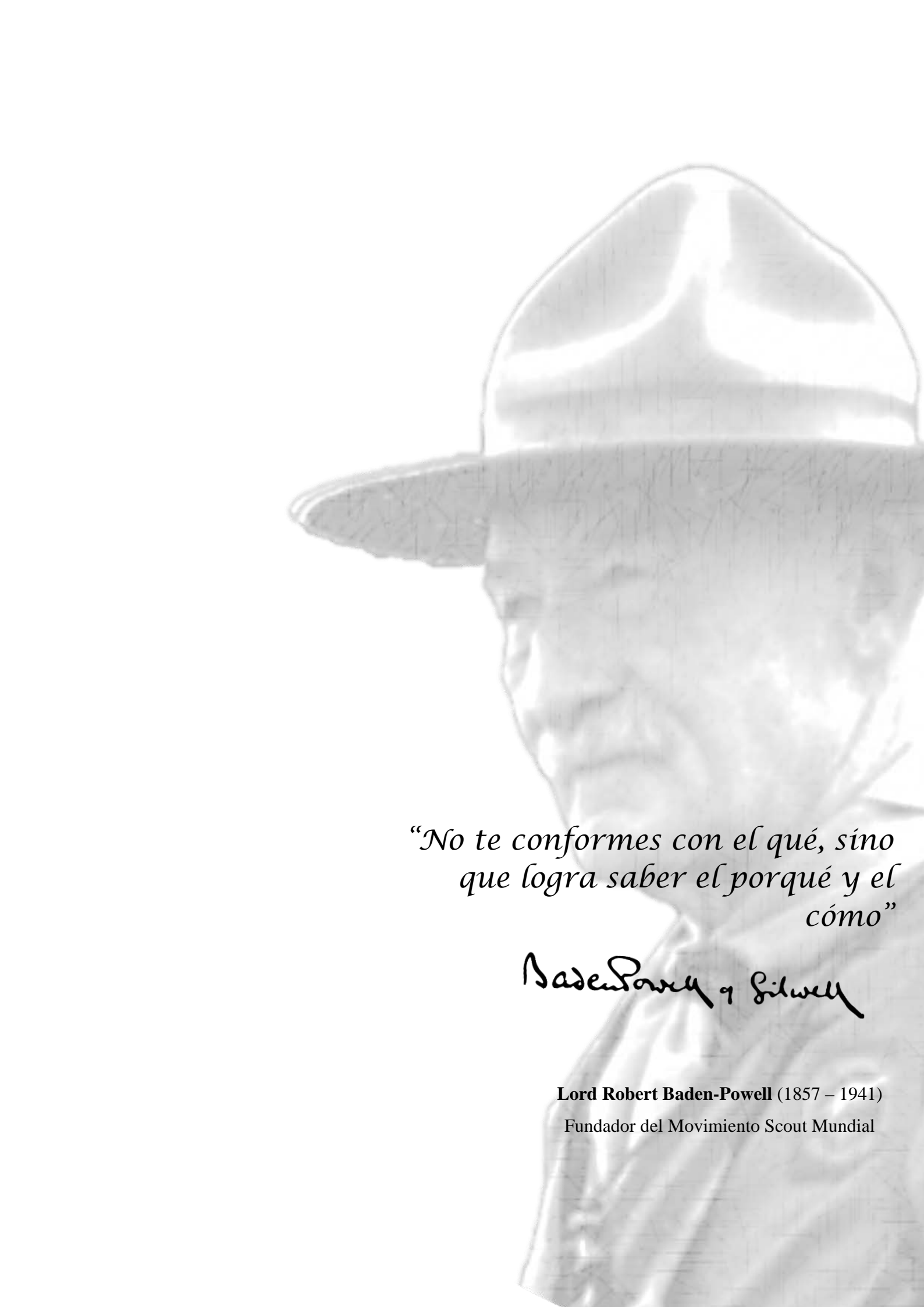
Esther A. Jiménez  
Quintana

Irene Espinosa  
Martos

Juan Miguel  
Rodríguez Gómez

En Madrid, a 31 de octubre de 2017





*“No te conformes con el qué, sino  
que logra saber el porqué y el  
cómo”*

*Baden-Powell y Gilwell*

**Lord Robert Baden-Powell (1857 – 1941)**

Fundador del Movimiento Scout Mundial



## AGRADECIMIENTOS

---

Quisiera dar las gracias a todas las personas que de una u otra manera han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A los directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria durante el período de realización de esta Tesis Doctoral, María Dolores Selgas y Gonzalo García de Fernando, por aceptarme en este Departamento.

Especial mención a mis directores de Tesis, por su paciencia y su buen hacer. A Juan Miguel, que con su criterio apoyado en su profundo conocimiento e ideas, ha sido capaz de encender en mi cabeza la chispa de la curiosidad. Juan, gracias por dejarme formar parte de este grupo, por todo el tiempo que has invertido en mí y por todas las anécdotas con las que sacar unas risas a pesar del aluvión de trabajo. A Esther, por haber apostado siempre por mí y no matarme cuando, alguna que otra vez, me lo he ganado. A Irene, que a pesar de mi incapacidad numérica, nunca me dio con un matraz en la cabeza en su intento por hacerme comprender la estadística.

A la gente que me ha acompañado en estos años en el laboratorio, Marta, Laura, Diana, Rebeca, Nivia, Pilar, Cristina, Marina, y a los demás becarios del Departamento, que han supuesto un apoyo en las alegrías y penurias durante estos años. En este punto no puedo olvidar a Susana, mi “compañera de trabajo”, con la que he compartido tantas horas de charla, desahogos y trabajo duro. A todos los profesores del Departamento, tanto del Área de Higiene como de Tecnología. Por su ayuda y orientación, y por los ratos pasados en nuestra cocina, con todos sus temas escabrosos incluidos.

A mis tutores, James Galagan y Kirsi Jarvinen-Seppo, en la *Boston University* (EE.UU.) y en la *University of Rochester* (EE.UU.) respectivamente, y a toda la gente que conocí durante mis estancias. Gracias por vuestra acogida y el esfuerzo que hicisteis todos por entenderme, literalmente hablando. Han sido ambas unas experiencias inolvidables.

A mi familia, especialmente a mis padres, por inculcarme el sentido de la responsabilidad y el buen hacer, sorprendentemente imprescindibles en la vida adulta. Por supuesto gracias también a ellos por su soporte, a todos los niveles, desde el mundano dinero al más trascendente apoyo moral. Gracias a ellos he seguido adelante estos años. A mis hermanos, que se han llevado gran parte de mis cabreos y salidas del tiesto. A mis amigos y amigas, que siempre han estado dispuestos a escucharme y a tomarse algo para olvidar, alguna vez, y para celebrar, la mayoría de las veces.

Al Ministerio de Economía, Industria y Competividad, por concederme la beca predoctoral que me ha permitido realizar esta Tesis.

Muchas gracias a todos



# ÍNDICE

---

<b>CAPÍTULO I. RESUMEN</b> .....	1
I.1. RESUMEN EN CASTELLANO .....	3
I.2. RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY) .....	8
 <b>CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN</b> .....	13
II.1. FISIOLÓGÍA DE LA LACTANCIA HUMANA .....	15
II.1.1. Evolución de la lactancia .....	15
II.1.2. Anatomía de la glándula mamaria .....	16
II.1.3. Desarrollo de la glándula mamaria .....	18
 II.2. CALOSTRO Y LECHE HUMANA .....	20
II.2.1. Calostro.....	20
II.2.2. Leche humana .....	21
II.2.2.1. Composición de la leche humana .....	22
II.2.2.1.1. Componentes nutricionales .....	24
II.2.2.1.1.a. Macronutrientes .....	24
II.2.2.1.1.b. Micronutrientes .....	27
 II.3. FACTORES INMUNOLÓGICOS .....	29
II.3.1. Células del SI de la madre en leche .....	29
II.3.2. Inmunoglobulinas .....	30
II.3.3. Citoquinas y quimioquinas .....	31
 II.4. MICROBIOTA Y MICROBIOMA DE LA LECHE HUMANA .....	34
II.4.1. Estudios basados en las técnicas de cultivo .....	34
II.4.2. Estudios basados en las técnicas independientes de cultivo .....	36
II.4.3. Factores que influyen en la composición de microbiota/microbioma de la leche humana .....	37
 II.5. MASTITIS.....	39
II.5.1. Introducción .....	39
II.5.2. Mastitis: definición y clasificación .....	40
II.5.3. Etiopatogenia y sintomatología de las mastitis lactacionales .....	41



II.5.3.1. Mastitis agudas .....	43
II.5.3.2. Mastitis subagudas y subclínicas .....	44
II. 5.3.3. Mastitis granulomatosas .....	46
II.5.4. Factores que protegen o que predisponen a las mastitis. ....	48
II. 5.4.1. Factores relacionados con el hospedador .....	49
II. 5.4.2. Factores microbianos .....	50
II. 5.4.3. Factores médicos .....	52
II.5.5. Diagnóstico microbiológico .....	54
II.5.5.1. Los cultivos de leche: una herramienta imprescindible .....	54
II.5.5.2. Recogida, transporte y conservación de las muestras .....	58
II.5.5.3. Medios de cultivo e inoculación .....	59
II.5.5.4. Condiciones de incubación de los cultivos .....	59
II.5.5.5. Lectura de los cultivos .....	60
II.5.5.6. Criterios para la interpretación e informe de resultados .....	61
II.5.6. Tratamiento de las mastitis .....	62
II.5.6.1. Tratamiento empírico de las mastitis agudas .....	63
II.5.6.2. Tratamiento de las mastitis subagudas .....	66
II.5.6.3. ¿Por qué los antibióticos fracasan frecuentemente en el tratamiento de las mastitis? .....	67
II.5.6.4. Antiinflamatorios .....	69
II.6. PROBIÓTICOS: DEL LABORATORIO AL CONSUMIDOR .....	70
II.6.1. Identificación de la cepa .....	71
II.6.2. Seguridad de la cepa .....	74
II.6.2.1. Consideraciones generales .....	74
II.6.2.2. Patogenicidad .....	76
II.6.2.3. Producción de D-lactato .....	77
II.6.2.4. Producción de aminas biógenas .....	78
II.6.2.5. Resistencia a antibióticos .....	79
II.6.2.6. Efectos negativos sobre el sistema inmunitario .....	80
II.6.3. Seguridad de los excipientes .....	80
II.6.4. Modelos de evaluación de la seguridad .....	81
II.6.5. Funcionalidad .....	82
II.6.5.1. Prerrequisitos .....	83
II.6.5.2. Propiedades funcionales propiamente dichas .....	85
II.6.6. Aspectos tecnológicos .....	88
II.6.7. Aspectos comerciales .....	90

II.7. MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL .....	93
II.7.1. Diversidad de la microbiota gastrointestinal .....	94
II.7.2. Adquisición y evolución de la microbiota intestinal infantil .....	98
II.7.2.1. Periodo fetal .....	98
II.7.2.2. Nacimiento y periodo postnatal .....	99
II.7.2.3. Funciones de la microbiota intestinal .....	101
II.7.3. Modulación de la microbiota intestinal materno-infantil .....	104
 CAPÍTULO III. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS .....	109
 CAPÍTULO IV. PUBLICACIONES .....	115
IV.1. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women .....	119
IV.2. Milk and blood biomarkers associated to the clinical efficacy of a probiotic for the treatment of infectious mastitis .....	131
IV.3. Gene expression modulation of milk somatic cells of women with mastitis in response to the consumption of <i>Lactobacillus salivarius</i> PS2 .....	147
IV.4. Physiological translocation of lactic acid bacteria during pregnancy contributes to the composition of the human milk microbiota .....	165
IV.5. Administration of <i>Bifidobacterium breve</i> PS12929 and <i>Lactobacillus salivarius</i> PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study .....	183
IV.6. Safety and tolerance of three probiotic strains in healthy infants: a multi-centre randomized, double-blind, placebo-controlled trial .....	197
IV.7. A placebo-controlled, double-blind, randomized study to investigate the effect of three probiotic strains on infants' gut microbial and immunological composition .....	209
 CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL .....	233
V.1. Metagenoma de la leche humana: de la fisiología a las mastitis .....	235
V.2. Tratamiento de las mastitis con la cepa <i>L. salivarius</i> PS2. Búsqueda de marcadores microbiológicos, inmunológicos, bioquímicos y transcriptómicos asociados con su eficacia .....	238
V.3. Efecto de la translocación bacteriana durante la gestación en la composición de la microbiota de la leche humana .....	247
V.4. Modulación de la microbiota de los niños prematuros mediante el empleo de cepas probióticas aisladas de la leche humana .....	253
V.5. Modulación de la microbiota infantil mediante el empleo de cepas probióticas comerciales .....	257

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES .....	263
CAPÍTULO VII. TABLAS Y FIGURAS .....	269
VII.1. Tablas .....	271
VII.2. Figuras .....	271
CAPÍTULO VIII. GLOSARIO .....	273
CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA .....	277

# CAPÍTULO I

---

## RESUMEN



# CAPÍTULO I. RESUMEN

## I.1. RESUMEN EN CASTELLANO

---

Nuestro conocimiento de la estructura y dinámica de la comunidad microbiana es esencial para obtener una comprensión del desarrollo humano y su fisiología. La importancia de esta comunidad es tal que algunos autores la consideran un órgano en sí misma, con una serie de funciones imprescindibles para nuestra vida. En los últimos años se han realizado numerosos estudios para evaluar la composición del microbioma asociado a las diferentes mucosas y epitelios del cuerpo humano y a los diferentes fluidos biológicos asociados a las mismas.

En el caso de la leche humana, su microbiota parece desempeñar un papel relevante en el proceso de transmisión vertical de microorganismos que se produce durante las primeras etapas de la vida, por lo que su estudio es particularmente relevante. La aplicación de técnicas dependientes de cultivo ha mostrado que las mastitis que se producen durante la lactancia se caracterizan por una notable alteración en la composición cuantitativa y cualitativa de la microbiota de la leche humana. Sin embargo, hasta la fecha no se había realizado ningún estudio metagenómico específicamente enfocado en esta patología. Por ello, en la primera parte de esta Tesis Doctoral se recogieron muestras de leche humana de 10 mujeres sanas y de 10 mujeres con síntomas de mastitis, se extrajo el ADN y se sometió a un análisis metagenómico empleando la plataforma de pirosecuenciación 454 (Roche).

Las secuencias de ADN humano constituyeron aproximadamente el 90% de todas las lecturas en las muestras analizadas. Por lo que respecta a las secuencias bacterianas, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes fueron los filos dominantes. El microbioma común en la leche de las mujeres sanas comprendía los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* y *Propionibacterium*, mientras que se observó un alto grado de variabilidad interindividual a nivel de especie. En contraste, las secuencias pertenecientes a *Staphylococcus aureus* fueron las que dominaron claramente en las muestras de las mujeres con mastitis aguda. También se observó un aumento en las secuencias de *Staphylococcus epidermidis* en las procedentes de mujeres con mastitis subaguda. Todos los casos de mastitis manifestaban una pérdida de diversidad bacteriana con respecto a las muestras procedentes de mujeres sanas.

Además, se pudieron detectar secuencias pertenecientes a virus, arqueas, mohos, levaduras y protozoos en prácticamente todas las muestras. Globalmente, los resultados obtenidos indican que la leche humana contiene un complejo metagenoma microbiano.

Estudios previos han demostrado la eficacia de la administración oral de ciertas cepas de lactobacilos aisladas a partir de la leche humana para el tratamiento de las mastitis. En esta Tesis se ha realizado un ensayo clínico para la misma diana empleando una nueva cepa de *Lactobacillus salivarius*, igualmente aislada de leche humana. El principal objetivo de este ensayo fue la detección de biomarcadores microbiológicos, bioquímicos e inmunológicos que expliquen los efectos de esta cepa en las voluntarias del estudio, que incluyeron tanto mujeres sanas ( $n = 8$ ) como con mastitis ( $n = 23$ ). Todas las participantes recibieron tres dosis diarias ( $10^9$  ufc) de *L. salivarius* PS2 durante 21 días, recogiendo muestras de leche, sangre y orina tanto antes como después de la intervención con el probiótico. En el grupo de mujeres con mastitis, la administración oral de *L. salivarius* PS2 condujo a la desaparición total o parcial de la sintomatología. La mejoría clínica se acompañó de la reducción de los recuentos de bacterias en leche, del número de leucocitos en leche y sangre y del nivel de interleuquina IL-8 en leche; paralelamente, se observó un aumento en las concentraciones de IgE, IgG<sub>3</sub>, EGF e IL-7, una reducción de algunos biomarcadores de estrés oxidativo y una modificación del perfil electrolítico de la leche. En el grupo de mujeres sanas, la concentración de TGF- $\beta_2$  aumentó tras la intervención con el probiótico, un cambio que puede mejorar la salud intestinal del lactante.

Para complementar el análisis, se extrajo el ARN de 8 muestras de leche (3 de mujeres sanas y 5 con mastitis) y se realizó un análisis transcriptómico mediante el empleo de *microarrays*. La importancia de este trabajo reside en que es el primero que determina la expresión de genes en la leche humana en casos de mastitis, antes y después del tratamiento con un probiótico. Los resultados obtenidos muestran un estado inicial de inflamación, con un fuerte componente de muerte celular, que desaparece tras la ingesta del probiótico, momento en el que predomina la expresión de genes relacionados con la actividad normal celular. Además, en el caso de las mujeres sanas, se observó un aumento en la expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de TGF- $\beta$ , confirmando el resultado obtenido previamente con las técnicas inmunológicas.

Las bacterias presentes en la leche humana pueden provenir de diferentes fuentes y estudios recientes sugieren que, al menos algunas de ellas, pueden estar presentes originalmente en el tracto digestivo materno y alcanzar la glándula mamaria a través de una vía endógena durante el último tercio del embarazo y la lactancia. Para estudiar esta posible transferencia entero-mamaria se procedió a la transformación de dos cepas de bacterias lácticas (*Lactococcus lactis* MG1614 y *L. salivarius* PS2) con un plásmido construido de *novo* y que contenía los genes *lux*; posteriormente, las cepas transformadas se administraron por vía oral a ratones gestantes y posteriormente lactantes con el fin de dilucidar si podían translocar y colonizar la glándula mamaria y, por ende, la leche. El modelo murino permitió el aislamiento y la detección por PCR de las bacterias transformadas en diferentes localizaciones, incluyendo el tejido mamario y la leche, reforzando la hipótesis

de que la translocación fisiológica de las bacterias maternas durante el embarazo y la lactancia puede contribuir a la composición de la microbiota de la leche.

Cada vez que un niño toma la leche de su madre recibe un inóculo de bacterias que puede ser particularmente relevante para la adquisición y evolución de la microbiota intestinal. La diversidad microbiana intestinal aumenta gradualmente durante el primer año de vida hasta que, aproximadamente a los 3 – 4 años, el perfil es similar a la microbiota de los adultos. Estos cambios están influenciados por factores médicos, culturales y ambientales, como el modo de nacimiento, la medicación recibida o la alimentación. Este desarrollo progresivo de la microbiota intestinal ofrece una ventana de tiempo en la cual se puede intervenir para corregir perfiles indeseables; en este contexto, en los últimos años se ha producido un aumento en el uso de probióticos con la intención de preservar o mejorar la salud infantil. Las especies con propiedades beneficiosas que se comercializan actualmente suelen pertenecer a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, ya que muchas de sus especies han recibido la presunción cualificada de seguridad por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Los efectos biológicos de los probióticos son específicos de cada cepa y, en consecuencia, el fracaso o el éxito para una diana concreta no pueden ser extrapolados de una cepa a otra, incluso de la misma especie. Por lo tanto, deben realizarse ensayos clínicos bien diseñados para investigar la seguridad y los posibles efectos beneficiosos asociados a cada cepa, aspectos que son particularmente relevantes cuando se destinan a la población infantil. En el marco de esta Tesis Doctoral, se realizaron dos ensayos clínicos, el primero dirigido a niños prematuros con un peso extremadamente bajo al nacer y el segundo a niños sanos de entre 3 y 12 meses.

En el primer caso, el ensayo consistió en la administración por vía oral de dos cepas probióticas aisladas de la leche materna (*Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934) a cinco niños prematuros durante su estancia en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN). Cada niño recibió dos dosis diarias ( $\sim 10^9$  ufc) de una mezcla 1:1 de ambas cepas. Para evaluar el efecto de la asociación de las cepas, se recogieron muestras de sangre y heces antes de la intervención y, posteriormente, en distintos tiempos. Todas las muestras biológicas se sometieron a un análisis inmunológico, incluyendo la detección y cuantificación de calprotectina. Además, se hizo un análisis microbiológico de las muestras de heces, incluyendo la investigación de la presencia de las cepas administradas.

Los resultados mostraron que el filo Firmicutes era el dominante en la mayoría de las muestras fecales. *L. salivarius* PS12934 se pudo detectar en todos los prematuros a partir del día 7 de intervención mientras que *B. breve* PS12929 apareció a partir del día 14, aumentando su número en las muestras fecales obtenidas posteriormente. La mayor frecuencia y concentración de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en las heces debe considerarse un resultado positivo debido a que el patrón de



colonización intestinal en los niños prematuros suele caracterizarse por un predominio de patógenos oportunistas y una disminución (e incluso ausencia) de esos dos géneros bacterianos.

Los estudios centrados en los parámetros inmunológicos fecales de los niños prematuros han sido prácticamente inexistentes hasta la fecha, lo que explica la ausencia de valores de referencia para esta población; en consecuencia, los resultados de este estudio pueden constituir un punto de partida para futuras investigaciones en el campo. En cualquier caso, los valores obtenidos al analizar los parámetros inmunológicos reflejan, globalmente, el estado de inmadurez del sistema inmunitario de esta población. El aumento de IgA observado el día 7 puede deberse a la colonización del intestino y coincide con la detección de una de las cepas. Finalmente, se observó una disminución notable en los niveles de calprotectina fecal (un marcador de inflamación intestinal particularmente relevante) a lo largo del tiempo. Se trata de resultados prometedores que debe ser confirmados en el futuro en una cohorte mayor.

Para evaluar la seguridad, la tolerancia y el efecto sobre la población infantil de 3 a 12 meses de las tres cepas probióticas (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* R0033, *Bifidobacterium bifidum* R0071 y *Lactobacillus helveticus* R0052) se realizó un estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, en el que participaron 221 niños sanos nacidos a término. Los niños se dividieron en 4 grupos: un grupo placebo y tres grupos en los que cada grupo recibió una de las tres cepas citadas anteriormente ( $3 \times 10^9$  ufc/día) durante 8 semanas. La evaluación de la seguridad de las cepas se basó en la determinación del crecimiento (peso, altura y circunferencia de la cabeza), de los efectos adversos, de las concentraciones de ácido D-láctico en orina, de las características de las heces y la repercusión del uso de medicación. Los 4 grupos fueron homogéneos con respecto a edad, sexo, tipo de alimentación, origen étnico, altura, peso y circunferencia de la cabeza al inicio del estudio. Los resultados mostraron que el crecimiento y el número de acontecimientos adversos era equivalente para todos los grupos de tratamiento al final del ensayo. No se registraron efectos adversos graves en ninguno de los grupos. Por lo tanto, los resultados obtenidos indican que el uso de *B. infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 y *B. bifidum* R0071 es seguro y bien tolerado en niños menores de un año.

Seguidamente, se analizó el microbioma (gen 16S rRNA) y diversos parámetros inmunológicos (tecnología de multiplex) en las muestras fecales obtenidas a partir de los niños participantes. El análisis de muestras fecales mostró que, tanto antes como después de la intervención, el género más abundante en los cuatro grupos de lactantes fue *Bifidobacterium*, representando aproximadamente el 50% de las secuencias. El microbioma de las muestras fecales procedentes de niños adscritos a alguno de los tres grupos “probiótico” no mostró cambios notables tras la intervención. En contraste, las muestras del grupo placebo evidenciaron una disminución en las secuencias correspondientes a *Bifidobacterium* y un aumento en las

pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus* y *Faecalibacterium* al finalizar el ensayo.

El análisis de una amplia gama de factores inmunológicos en las muestras fecales sugiere un efecto modulador por parte de las tres cepas probióticas durante el período de intervención. La relación antiinflamatoria IL-10/IL-12 aumentó al final del período de intervención en el grupo que recibió la cepa *B. infantis* R0033. La disminución de la relación IL-10/IL-12, junto con el aumento de la relación TNF $\alpha$ /IL-10, reveló un perfil claramente proinflamatorio en el grupo placebo.

En conclusión, el empleo de ciertas cepas que han demostrado su eficacia durante el embarazo, la lactancia o el periodo infantil,, representa una alternativa real en la modulación de la microbiota humana yy, por tanto, puede tener un papel relevante en el mantenimiento de la salud en el futuro.. De ahí la relevancia de que las cepas a las que se pretendan atribuir propiedades de probiótico sean seleccionadas y evaluadas en ensayos clínicos bien diseñados que confirmen su seguridad yy eficacia *kp'xkxq*.

## I.2. RESUMEN EN INGLÉS (SUMMARY)

---

Our knowledge of the structure and dynamics of the microbial community is essential to understand human development and its physiology. The importance of this community is such that some authors consider it an organ itself, with several essential functions for our life. Numerous studies have been carried out in the recent years to evaluate the composition of the microbiome associated to the different mucous and epithelia in the human body and the different biological fluids associated with them.

In the case of human milk, its microbiota seems to play a relevant role in the process of vertical transmission of microorganisms during the early stages of life, so its study is particularly relevant. The application of culture-dependent techniques has shown that lactacional mastitis is characterized by a strong alteration in the quantitative and qualitative composition of the human milk microbiota. However, to date no metagenomic studies specifically focused on this pathology have been performed. Therefore, in this Doctoral Thesis, human milk samples were collected from 10 healthy women and 10 from women with mastitis symptoms, the DNA was extracted and subjected to a metagenomic analysis using 454 pyrosequencing platform (Roche).

Human DNA sequences constituted approximately 90% of the reads in the analyzed samples. As regards bacterial sequences, Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes were the dominant phyla. The common microbiome in the milk of healthy women included *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* and *Propionibacterium* genera, while a high degree of inter-individual variability was observed at the species level. In contrast, the sequences belonging to *Staphylococcus aureus* were clearly dominant in samples of acute mastitis women. An increase was also observed in sequences of *Staphylococcus epidermidis* in subacute mastitis women. All cases of mastitis manifested a loss of bacterial diversity respecting to samples from healthy women. In addition, sequences belonging to viruses, archaea, molds, yeasts and protozoa could be detected in all samples. Overall, the result indicate that human milk contains a complex microbial metagenome

Previous studies have demonstrated the efficacy of oral administration of certain strains of lactobacilli isolated from human milk for the treatment of mastitis. In this Thesis, a clinical trial was carried out using a new strain of *Lactobacillus salivarius* isolated from human milk. The main objective of this trial was the detection of microbiological, biochemical and immunological biomarkers to explain the effects of this strain in the volunteers, which included both healthy women (n = 8) and mastitis (n = 23). All participants received three daily doses ( $10^9$ cfu) of *L. salivarius* PS2 for 21 days. Milk, blood and urine samples were collected before and after the intervention with the probiotic. In the group of women with mastitis, oral administration of *L. salivarius* PS2 led to the total or partial disappearance of the symptomatology.

The clinical improvement was accompanied by the reduction of bacterial counts in milk, the number of leukocytes in milk and blood and the level of interleukin IL-8 in milk. In parallel, an increase in IgE, IgG<sub>3</sub>, EGF and IL-7 levels was observed. Some oxidative stress biomarkers presented a reduction and a modification of the electrolytic profile of the milk was detected. In the group of healthy women, the concentration of TGF- $\beta$ <sub>2</sub> increased following intervention with the probiotic, a change that could improve the intestinal health of the infant.

To complement the analysis, RNA was extracted from 8 milk samples (3 healthy women and 5 with mastitis) and a transcriptomic analysis was performed using microarrays. The importance of this work is that it is the first that determines the expression of genes in human milk in cases of mastitis, before and after treatment with a probiotic. The results show an initial state of inflammation, with a strong component of cell death, which disappears after the ingestion of the probiotic. Gene expression related to normal cellular activity predominates at the end of the intervention. In addition, in the case of healthy women, an increase in the expression of genes related to TGF- $\beta$  biosynthesis was observed, confirming the result obtained previously with the immunological techniques.

Bacteria present in human milk may come from different sources. Recent studies suggest that at least some of them may be present originally in the maternal digestive tract and reach the mammary gland through an endogenous pathway during the last third of pregnancy and breastfeeding. To study this possible entero-mammary pathway, two strains of lactic bacteria (*Lactococcus lactis* MG1614 and *L. salivarius* PS2) were transformed with a newly constructed plasmid containing the *lux* genes. Subsequently, the transformed strains were orally administered to pregnant and lactating mice" in order to determine if they could translocate and colonize the mammary gland and hence the milk. The murine model allowed the isolation and PCR detection of transformed bacteria at different locations, including breast tissue and milk, reinforcing the hypothesis that the physiological translocation of maternal bacteria during pregnancy and lactation contributes to the milk microbiota composition.

Each time a child takes milk from its mother it receives a bacterial inoculum that may be particularly relevant for the acquisition and evolution of the intestinal microbiota. During the first year of life, intestinal microbial diversity gradually increases until about 3-4 years, when the profile is similar to that of the microbiota of adults. These changes are influenced by medical, cultural and environmental factors, such as the mode of birth, medication received or type of feeding. This progressive development of the intestinal microbiota offers a window of time in which can be intervened to correct undesirable profiles. In this context, there has been an increase in the use of probiotics in recent years with the intention of preserving or improving the health of children. The species with beneficial properties currently marketed usually

belong to *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* genera, since many of their species have received the Qualified Presumption of Safety by the European Food Safety Authority (EFSA). The biological effects of probiotics are specific to each strain and, as a result, failure or success for a particular target cannot be extrapolated from one strain to another, even from the same species. Therefore, well-designed clinical trials should be conducted to investigate the safety and possible beneficial effects associated with each probiotic strain, aspects that are particularly relevant when pediatric populations are targeted. Within the framework of this PhD Thesis, two clinical trials were conducted, the first aimed at premature infants with extremely low birth weight and the second to healthy infants aged 3 to 12 months.

In the first case, the trial consisted of the administration of two probiotic strains isolated from human milk (*Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934) to five preterm infants orally during their stay in the NICU. Each infant received two daily doses ( $\sim 10^9$  cfu) of a 1:1 mixture of both strains. To evaluate the effect of the strains, samples of blood and faeces were collected before the intervention and, later, at different times. All biological samples were subjected to immunological analysis, including detection and quantification of calprotectin. In addition, a microbiological analysis of faecal samples was carried out, including the investigation of the possible presence of the administered strains.

The results showed that the phylum Firmicutes was dominant in most fecal samples. *L. salivarius* PS12934 could be detected in all infants from day 7 while *B. breve* PS12929 appeared from day 14, increasing its concentrations in the fecal samples obtained thereafter. The higher frequency and concentration of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in feces should be considered a positive result because the pattern of intestinal colonization in the premature population is usually characterized by a predominance of opportunistic pathogens and a decrease (and even absence) of these two bacterial genera.

Studies focusing on the fecal immunological parameters of preterm infants have been practically non-existent to date, which explains the absence of reference values for this population; consequently, the results of this study may be a starting point for future research in the field. In any case, the values obtained when analyzing the immunological parameters reflect, overall, the state of immaturity of the immune system of this population. The increase in IgA observed on day 7 may be due to colonization of the intestine and coincides with the detection of one of the strains. Finally, a significant decrease in fecal calprotectin levels (a particularly relevant marker of intestinal inflammation) was observed over time. These are promising results that should be confirmed in the future in a larger cohort.

A multicenter, randomized, double-blind study was performed to evaluate the safety, tolerance and effect of three probiotic strains

(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* R0033, *Bifidobacterium bifidum* R0071 and *Lactobacillus helveticus* R0052) on 3 to 12 months old infants. In the study, 221 healthy term-born infants participated. The infants were divided into 4 groups: one placebo group and three probiotics groups. Each probiotic group received one of the 3 strains cited above ( $3 \times 10^9$  cfu / day). The intervention period was 8 weeks. Safety evaluation of the strains was based on determination of growth (weight, height and head circumference), adverse events, D-lactic acid in urine concentration, fecal characteristics and use of medication. The 4 groups were homogeneous with respect to age, sex, type of diet, ethnic origin, height, weight and head circumference at the beginning of the study. The results showed that growth and total number of adverse events were equivalents among the four groups at the end of the trial. No serious adverse events were reported in any group. Therefore, the results obtained indicate that the use of *B. infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 and *B. bifidum* R0071 is safe and well tolerated in infants under one year of age.

Next, the microbiome (16S rRNA gene) and various immunological parameters (multiplex technology) were analyzed in the fecal samples obtained from the participating infants. Analysis of fecal samples showed that, before and after the intervention, the most abundant genus in the four groups of infants was *Bifidobacterium*, representing approximately 50% of the sequences. The microbioma of fecal samples from infants assigned to any of the three "probiotic" groups did not show any notable changes after the intervention. In contrast, the samples in the placebo group showed a decrease in the sequences corresponding to *Bifidobacterium* and an increase in *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium* and after the intervention period.

Analysis of a wide range of immunological factors in fecal samples suggests a modulating effect of all three probiotic strains during the intervention period. The anti-inflammatory relationship IL-10 / IL-12 increased at the end of the intervention period in the group receiving the *B. infantis* R0033 strain. The decrease in the IL-10 / IL-12 ratio, together with the increased TNF $\alpha$  / IL-10 ratio, revealed a clearly pro-inflammatory profile in the placebo group.

In conclusion, the use of probiotics during pregnancy, lactation or infant period represents a real alternative in the modulation of human microbiota and therefore can play an important role in maintaining health in the future. However, strains should be carefully selected and evaluated in well-designed clinical trials that confirm their safety and efficacy *in vivo*.





## CAPÍTULO II

---

## INTRODUCCIÓN





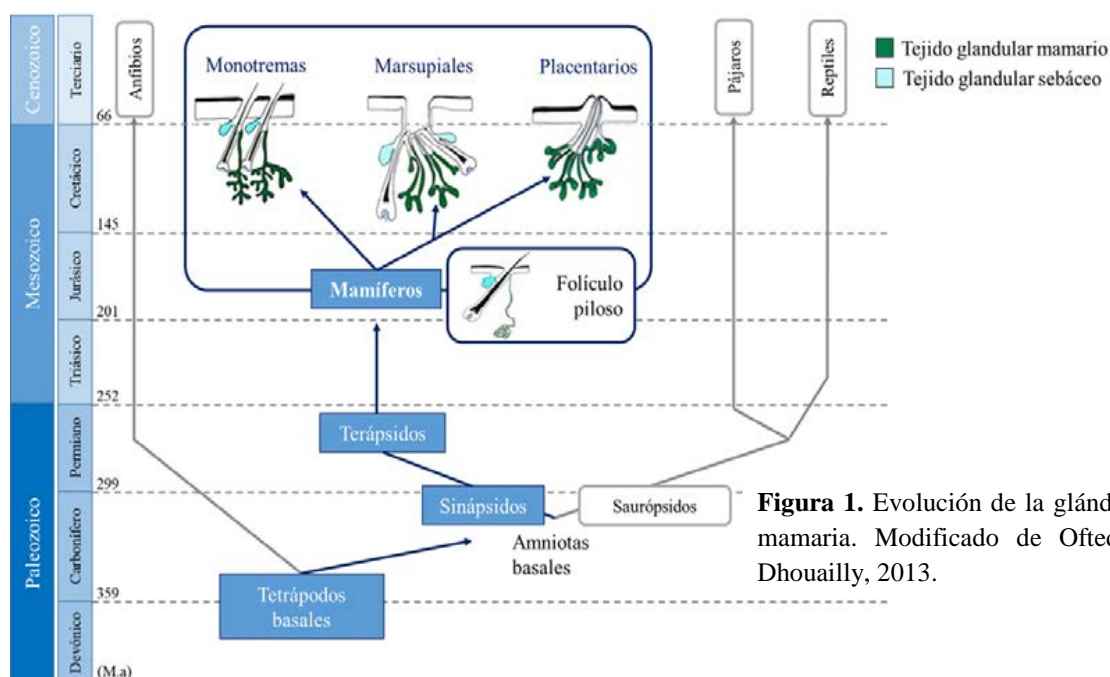
# CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN

## II.1. FISIOLÓGÍA DE LA LACTANCIA HUMANA

### II.1.1. Evolución de la lactancia

Los mamíferos se caracterizan por poseer unas glándulas exocrinas que secretan leche para nutrir a la descendencia neonatal incapaz de alimentarse por sí misma. Este tipo de alimentación facilita la protección inmunológica, la identificación de olores de la madre y la fuerte adherencia materna (Koyama et al. 2013). La presencia de estas glándulas secretoras fue la característica que utilizó Linneo en 1758 para dar nombre a la Clase Mamíferos (Lefevre et al. 2010).

El origen de la glándula mamaria está enterrado en el tiempo, ya que parece haberse originado hace más de 300 millones de años (M.a.) en el período geológico del Carbonífero (**Fig. 1**). Los primeros vertebrados totalmente terrestres, los amniotas basales, evolucionaron a partir de tetrápodos anteriores (antepasados de anfibios y otras formas terrestres) de los que heredaron un tegumento glandular (Oftedal, Dhouailly 2013). En el Carbonífero surgieron dos linajes de amniotas: los saurópodos y los sinápsidos. En estos últimos, fue la especialización de las glándulas en el integumento lo que desarrolló la forma actual de las glándulas mamarias en un periodo de tiempo de aproximadamente de 130 M.a. (Oftedal, Dhouailly 2013). El hecho de que las glándulas mamarias y sus productos secretores (incluidos los glóbulos de grasa, las micelas de caseína, las proteínas de suero y los azúcares) se asemejen estructuralmente en todos los mamíferos, ya sean monotremas de puesta de huevos (p. ej. ornitorrinco), marsupiales (p.ej. canguros), o placentarios (p. ej. humanos),



**Figura 1.** Evolución de la glándula mamaria. Modificado de Oftedal, Dhouailly, 2013.

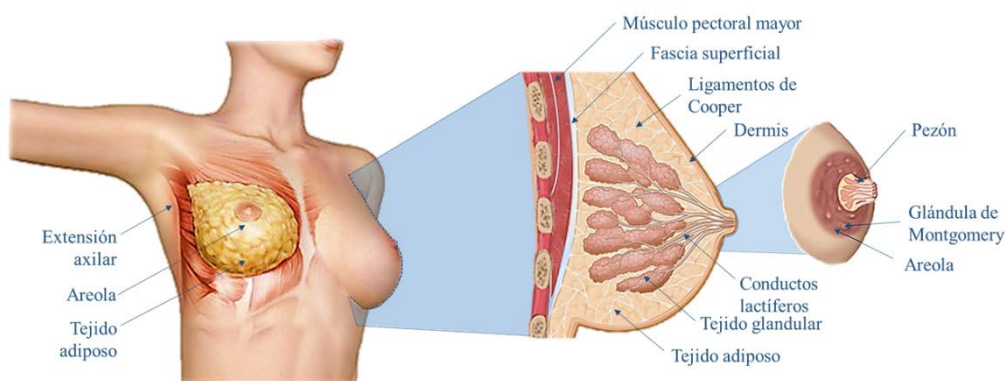
evidencia que el desarrollo de las glándulas mamarias tuvo lugar antes de la existencia de los mamíferos.

La estructura de la glándula mamaria guarda una gran similitud con las glándulas de la piel, pero distinguir el tipo exacto de glándula desde la que ha evolucionado es aún un hecho controvertido. Se ha sugerido que la evolución de la glándula mamaria parte de la combinación de las diferentes glándulas de la piel en un nuevo complejo funcional (Blackburn 1993) pero también de las glándulas apocrinas asociadas a los folículos pilosos (Ofstedal 2002). En monotremas, esta relación entre el folículo piloso y la glándula mamaria es evidente ya que la glándula no presenta pezón y los ductos mamarios desembocan asociados a los folículos pilosos directamente en la areola. Algo similar sucede en los marsupiales (Lefevre et al. 2010). En cambio, en los mamíferos placentarios, como los humanos, esta asociación ha desaparecido y la glándula mamaria se desarrolla independientemente de los folículos precediéndolo en el tiempo.

El desarrollo y la anatomía de las glándulas mamarias de los mamíferos no placentarios han sido intensamente estudiado porque proporciona información sobre el origen evolutivo de la lactancia.

### II.1.2. Anatomía de la glándula mamaria

En los humanos, en la mujer adulta, las glándulas mamarias se encuentran en el interior de las mamas, con una cantidad variable de tejido adiposo y conectivo denso, que determinan la consistencia y volumen de estas protuberancias redondeadas dispuestas simétricamente en relación a la línea alba. Las mamas están localizadas en la fascia superficial de la pared torácica anterior, sobre el músculo pectoral mayor y, mediante los ligamentos de Cooper, fijada a su fascia y a la dermis (Mediano 2015). Existe cierta separación del músculo gracias al espacio retromamario, que permite que la mama tenga una cierta movilidad (Tortora, Derrickson 2013) (**Fig. 2**).



**Figura 2.** Anatomía de la glándula mamaria.

La mama tiene una zona central pigmentada, de color oscuro y rugosa, con un diámetro de 3 a 5 cm llamada areola, cuyo aspecto y tamaño cambian durante el embarazo y la lactancia. En ella se encuentran las glándulas de Montgomery (entre 12 y 20) que producen una secreción sebácea para mantener lubricados tanto la areola como el pezón y mantener el pH de la piel, evitando así el crecimiento de ciertos microorganismos (Smith et al. 1982). Esta secreción sebácea tiene en su composición una serie de compuestos volátiles que son capaces de condicionar el comportamiento del lactante, atrayéndole hacia el pezón y estimulándolo a mamar, favoreciendo el vínculo materno-filial (Doucet et al. 2009).

En el centro de la areola se sitúa el pezón que se levanta como una gruesa papila con forma de cilindro o cono. En el extremo del pezón se observan unos orificios (una media de 4, aunque el rango oscila entre 1 y 8) por donde se secreta la leche (Jutte et al. 2014), que en mujeres no lactantes están taponados con queratina. El pezón está formado por tejido eréctil, con fibras musculares lisas que se disponen circular, radial y longitudinalmente, con capacidad para actuar como un esfínter (Tezer et al. 2012). Cuando el pezón se presenta como una depresión en lugar de una protrusión, se denomina pezón plano o pezón invertido, considerándose una anomalía (**Fig. 3**).



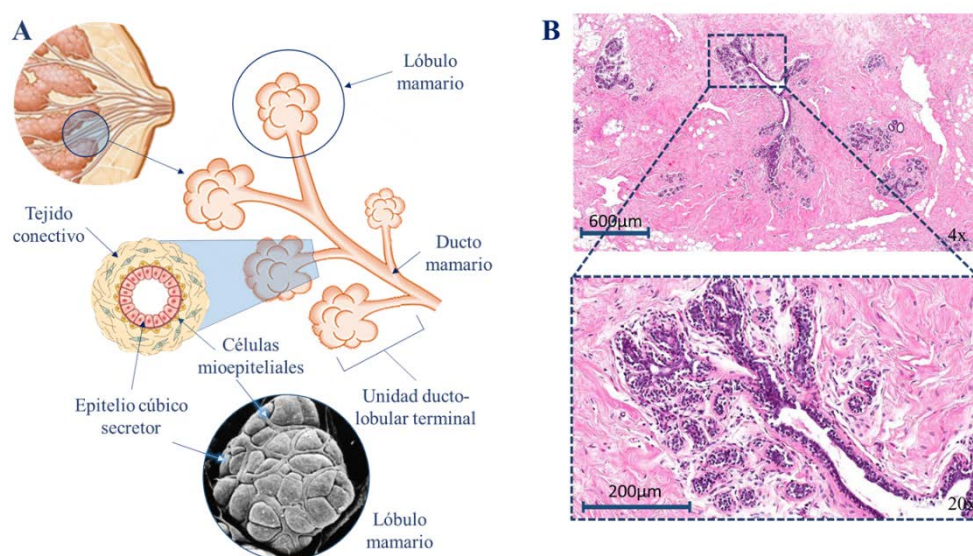
**Figura 3.** Tipos de pezón.

La glándula mamaria es un tipo de glándula altamente diferenciada y especializada en la producción de leche (Musumeci et al. 2015) y no es en realidad una, sino varias. El uso de ultrasonidos ha permitido conocer mejor su anatomía, desechando algunas creencias erróneas como la existencia de senos lactíferos como reservorio de la leche (Hassiotou, Geddes 2013). En su lugar, por debajo de la areola, los ductos se ramifican, existiendo tejido glandular al igual que en el resto de la mama. Es decir, fisiológicamente, los conductos principales sólo se dilatan después de la eyección de leche y su función es exclusivamente la de transportar la leche hacia el pezón (Ramsay et al. 2005, Gooding et al. 2010). A pesar de ello, parece que para proporcionar una gratificación inmediata al lactante, se almacena algo de leche, aunque esta función la realiza el conjunto del sistema ductal (Gooding et al. 2010).

Las unidades ductulobulares terminales son las unidades funcionales de la mama que constan de ductos terminales extralobulares y ductos terminales

intralobulares. Estos últimos forman el espacio central del lóbulo y tienen múltiples evaginaciones que durante la lactancia se diferenciarán en unidades secretoras (acinos o alveolos) (**Fig. 4**).

Los alveolos y los conductos están tapizados por dos capas de células: una capa de epitelio columnar o cuboide con capacidad para secretar leche completa y una capa discontinua basal de células mioepiteliales contráctiles que envuelve a la anterior como si fuera una malla. Éstas últimas tienen la función de contraerse para expulsar la leche hacia el pezón. También contribuyen a establecer la polaridad de las células epiteliales y estructurar el desarrollo de la glándula mamaria y la diferenciación celular (Johnson 2010).



**Figura 4.** Estructura del lobulillo mamario. A, Organización anatómica. B, Corte histológico de glándula mamaria en reposo. Hematoxilina-Eosina.

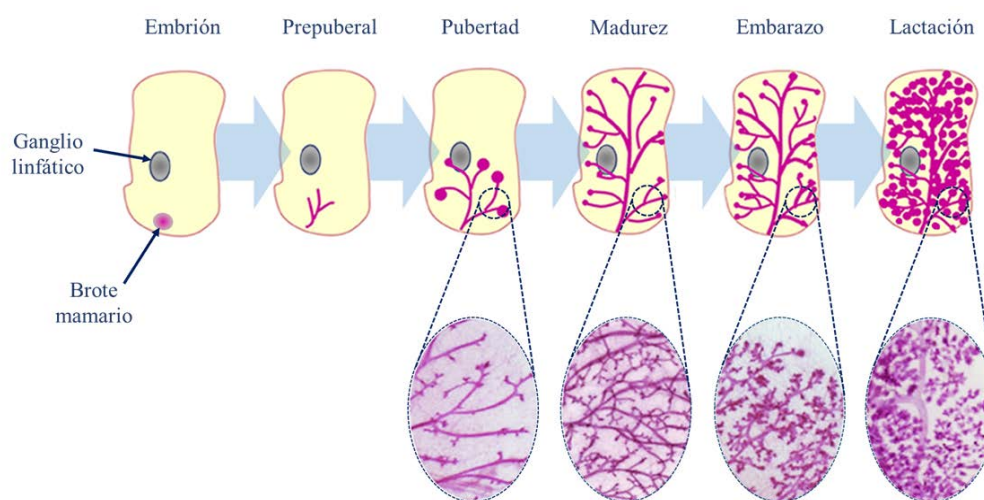
### II.1.3. Desarrollo de la glándula mamaria

El crecimiento de la glándula mamaria tiene lugar en distintas fases de la vida de la mujer. Comienza en el periodo embrionario con la formación de la cresta y las yemas mamarias (**Fig. 5**). Al nacimiento, la glándula mamaria es solo un esbozo de lo que llegará a ser en su madurez. Desde el nacimiento hasta la pubertad, la glándula mamaria solo presenta un desarrollo en tamaño relacionado con el crecimiento general del cuerpo. Sin embargo, al llegar la pubertad y la consiguiente activación del eje endocrino hipotálamo-hipófisis-ovario, las hormonas producidas entonces activan el crecimiento y diferenciación de las partes distales de los conductos mamarios. En esta región terminal encontramos células madre de fenotipo mamario, las cuales, al estimularse por la acción de las hormonas, permiten el crecimiento a través del tejido adiposo adyacente, formando una red de ductos mamarios. Una de las señales endocrinas responsables de esta expansión tisular es la hormona del crecimiento (GH, del inglés *Growth Hormone*), que se secreta en la pituitaria y ejerce su efecto en el estroma mamario, que a su vez secreta el factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1, del inglés *Insuline Growth Factor-1*) que estimula al



epitelio ductal para su desarrollo. Además de la GH, los estrógenos generados por el ovario al inicio de la pubertad estimulan la proliferación de las células madre mamarias mediante la producción de anfieregulina, una hormona de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *Epidermic Growth Factor*), siendo por tanto una acción hormonal conjunta y sinérgica la que estimula el desarrollo hacia la madurez funcional del tejido mamario (Macias, Hinck 2012).

Una vez alcanzado el desarrollo final de la mama, se suceden ciclos hormonales de estrógenos y progesterona en cada ciclo menstrual de la mujer, provocando un crecimiento en el número de ramificaciones de cara a una posible gestación. El embarazo está marcado por un incremento de la progesterona en sangre, la cual provoca una ramificación de los conductos mamarios y junto a la prolactina, la formación y desarrollo de los acinos mamarios, que en la lactación serán los responsables de proporcionar el volumen y la composición de leche adecuados para el crecimiento del lactante.



**Figura 5. Desarrollo embrionario y post parto de la glándula mamaria.** Partiendo del brote mamario, hay un cierto desarrollo del tejido glandular durante el periodo embrionario pero es llegada la pubertad, y con los ciclos hormonales, cuando hay un desarrollo importante del tejido, alcanzando su máxima expresión durante la lactancia. Tras este periodo, hay una involución del tejido pero nunca vuelve a la situación previa al embarazo, quedando siempre en una fase de mayor desarrollo de cara a futuras lactaciones.

La producción de leche estará inhibida por la progesterona hasta después del parto. En ese momento la prolactina, que se encuentra en altas concentraciones en sangre, se unirá a sus receptores en la glándula mamaria. Los receptores específicos para la progesterona desaparecen paulatinamente de las células secretoras a medida que disminuye la concentración de esta hormona y comienza la actividad secretora de la glándula mamaria. Así, una vez establecida la lactancia, la progesterona ya no es capaz de inhibir la acción de la prolactina que, junto con la oxitocina, serán los principales agentes que regulan la secreción de leche mediante un mecanismo neurohormonal.

## II.2. CALOSTRO Y LECHE HUMANA

---

Durante la gestación, el feto deglute en el útero, más de un litro por día de líquido amniótico que contiene aminoácidos, proteínas, vitaminas, minerales, hormonas y factores de crecimiento que influyen en el desarrollo y maduración del intestino fetal (Underwood 2013). A pesar de ello, tras el parto, el recién nacido es un ser aún inmaduro, por lo que el calostro y posteriormente la leche deben aportar los elementos necesarios para cubrir las necesidades que presenta, para la protección pasiva y el desarrollo y maduración de las células del Sistema Inmunitario (SI) y epiteliales del intestino.

### II.2.1. Calostro

El calostro es el primer fluido producido por la glándula mamaria tras el parto, o en ocasiones unos días antes, cuando las uniones estrechas en el epitelio mamario están todavía abiertas (Stelwagen, Singh 2014). Al estar abiertas estas uniones se permite el transporte pasivo de muchos más componentes inmunitarios procedentes del torrente sanguíneo de la madre hasta la leche (Gephart, Weller 2014). Con volumen, aspecto y composición diferente a la leche materna, que lo sigue en el tiempo, el calostro es producido en baja cantidad en los primeros días post-parto, es rico en componentes inmunitarios como la IgA, citoquinas antiinflamatorias, oligosacáridos, antioxidantes, lactoferrina y factores de crecimiento así como en leucocitos, todo ello de cara a la protección del lactante neonato (Ballard, Morrow 2013).

La composición del calostro está en concordancia con las reservas nutritivas y necesidades del recién nacido, cuyo aparato digestivo y sistema inmunitario distan mucho de ser maduros. El calostro contiene una alta concentración de proteínas, pero baja de lactosa y lípidos, siendo reflejo de sus principales funciones inmunológica y trófica (Gidrewicz, Fenton 2014). Además, los niveles de sodio, cloro y magnesio son mayores que en la leche materna, mientras que los niveles de calcio y potasio son menores (Ballard, Morrow 2013). Sin embargo, lo más llamativo del calostro es la variedad de macromoléculas con un papel bioprotector (Neville, Morton 2001).

El recién nacido posee cierta respuesta humoral gracias a las inmunoglobulinas (Ig's) que pasan a través de la placenta al feto durante el embarazo desde el torrente sanguíneo de la madre. A pesar de ello, el calostro (y la leche después) ofrece a las mucosas, en especial a la intestinal, una protección vital frente a las infecciones, hasta que el intestino del recién nacido madure y pueda secretar sus propias Ig's. Además de los compuestos inmunológicos, el calostro vehicula un importante número de células inmunológicas, hasta  $10^8$  células por día (Hassiotou, Geddes 2015). La mayoría de estas células son macrófagos (50% del total) que tienen actividad fagocítica y secretan factores

inmunoreguladores, que van a participar en el desarrollo y maduración del SI del recién nacido. El calostro también contiene linfocitos B y T, siendo estos últimos más frecuentes para compensar la inmadurez de las células T del neonato. Los neutrófilos presentes en el calostro parecen estar más involucrados en la autoprotección de la glándula mamaria (por ejemplo, frente a mastitis infecciosas) que en el desarrollo del sistema inmunitario del niño (Field 2005).

Por otra parte, el calostro es rico en  $\beta$ -caroteno, responsable de su característico color amarillo y de su alto poder antioxidante. El neonato se expone al ambiente extrauterino, pasando de un ambiente con baja carga de oxígeno a uno con una alta proporción, lo que supone un aumento del estrés oxidativo. Este cambio produce un aumento en el metabolismo aerobio, generando radicales libres que pueden dañar los tejidos (Simsek et al. 2015). Por ello esta clase de compuestos antioxidantes son necesarios para reducir el nivel de estrés oxidativo y evitar el daño del material genético (Lindmark-Mansson, Akesson 2000, Simsek et al. 2015). El poder antioxidante de la leche humana es mayor que el de las fórmulas infantiles (Aycicek et al. 2006) y es mayor en el caso de las leches de mujeres con partos prematuros que aquellas que paren a término (Abuhandan et al. 2015) así como en aquellas con parto vaginal respecto a parto por cesárea (Simsek et al. 2015).

El calostro contiene, en comparación con la leche madura, mayor contenido de fosfolípidos y una alta concentración de ácido araquidónico y ácido docosahexanoico (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga) fundamentales para el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) del neonato.

La composición del calostro pone de manifiesto que es un alimento clave para la nutrición, el crecimiento y el desarrollo del recién nacido en los primeros días de vida.

### II.2.2. Leche humana

La leche es un fluido biológico singular producido por los mamíferos que ha sido diseñado para cubrir las necesidades específicas de los recién nacidos de cada especie, incluyendo no solo las nutritivas. Por ello, es un fluido con una gran complejidad composicional en el que se encuentran glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales, nucleótidos y diversos compuestos bioactivos (**Tabla 1**). Su producción y composición relativa son flexibles y varían dependiendo de numerosos factores entre los que cabe mencionar el tiempo de lactancia o el estado nutritivo de la madre.

Tras el parto, las uniones estrechas del epitelio mamario se cierran, reduciéndose la ratio sodio/potasio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) y aumentando la secreción de lactosa. Entre los días 4 y 15 postparto, la leche secretada se denomina leche de transición (Ballard, Morrow 2013) y tiene algunas características en común con el calostro. En este periodo de tiempo, se registra un aumento brusco en la producción de leche.



Posteriormente, en los primeros 30 días el volumen de leche seguirá aumentando hasta alcanzar un volumen de 600-700 mL/día y en los siguientes 6 meses 700-900 mL/día de media, pudiendo llegar hasta los 1220 mL/día (Innis 2014). La composición de la leche varía a lo largo de la toma y también a medida que avanza la lactación: la concentración de Ig's, proteínas totales y vitaminas liposolubles disminuye, mientras que aumenta la de lactosa, lípidos y vitaminas hidrosolubles junto con el contenido calórico total.

En el caso de partos prematuros puede tener lugar un retraso en el comienzo de la lactogénesis resultando en un aumento en el tiempo de la disponibilidad de los componentes protectores y de desarrollo presentes en el calostro (Rodríguez et al. 2009), adaptándose así a las necesidades del recién nacido. La leche de mujeres que han dado a luz a un niño prematuro muestra menores niveles de citoquinas pro-inflamatorias y mayores de anti-inflamatorias, así como una cantidad superior de IgA con respecto a las mujeres con partos a término (Seigel et al. 2013).

#### *II.2.2.1. Composición de la leche humana*

La composición de la leche humana probablemente ha estado bajo una fuerte presión evolutiva durante millones de años y hay una tendencia a asumir que la leche normal “sana” es esencialmente la misma para todos los seres humanos. Sin embargo, factores ambientales, sociales, culturales y genéticos afectan a la composición de la leche. El efecto que ejerce cada uno de estos factores ha sido estudiado con diferentes resultados. Por ejemplo, es ampliamente conocido que la dieta afecta a la fracción lipídica de la leche y a algunos compuestos activos como la vitamina A; vitaminas solubles en agua como la vitamina B6, vitamina B12 y el folato; yodo y selenio (Innis 2014, Andreas et al. 2015, Yahvah et al. 2015). En cambio, hay pocos estudios al respecto de la relación entre la etnia o la edad de la madre y la composición de la leche. Recientemente se ha observado que la leche de mujeres mayores de 35 años parece contener mayor concentración de grasa en el calostro y de lactosa en leche madura que las mujeres más jóvenes (Lubetzky et al. 2016). También la etnia parece que afecta a la composición lipídica de la leche, en concreto al perfil de ácidos grasos de cadena corta en mujeres indias y malayas con el mismo tipo de dieta (Su et al. 2010).

Además de estos factores, también se ha de tener en cuenta que su producción y composición relativa también variará en función del tiempo de lactancia, el momento del día y de la toma (Andreas et al. 2015).

Tabla 1. Compuestos bioactivos del calostro y de la leche humana.

	Calostro	Leche madura
<b>Vitaminas hidrosolubles</b>		
Ácido ascórbico (mg)	80 – 100	40 – 100
Ácido pantoténico (mg)	2,5	2 – 2,5
Biotina (µg)	4,5	5 – 9
Folato (µg)	5 – 10	50 – 100
Niacina (mg)	0,5	1,5 – 2
Piridoxina, B6 (µg)	20 – 40	90 – 300
Riboflavina, B2 (µg)	500	300 – 400
Tiamina, B1 (µg)	20	160 – 210
Vitamina B12 (µg)	1,2 – 1,5	0,5 – 0,8
<b>Vitaminas liposolubles</b>		
Vitamina A y carotenoides		
Ésteres de retinol (µmol)	1,45 – 2,00	1,22
Carotenoides totales (µmol)	5,35	1,8 – 3,0
Caroteno α (µmol)	0,17	0,02 – 0,03
Caroteno β (µmol)	0,42	0,04 – 0,07
Criptoxantina β (µmol)	0,23	0,03 – 0,06
Luteína/zeaxantina (µmol)	0,2	0,04 – 0,10
Licopeno (µmol)	0,51	0,02 – 0,06
Vitamina D3 (colecalfiferol) (µg)	0,1 – 0,3	0,1 – 1,0
Tocoferol α (mg)	15	3 – 5
Tocoferol γ (mg)	1,5	1
Vitamina K		
Filoquinona, K1 (µg)	1,8 – 2,3	1,5 – 3,0
Menaquinona, K2 (µg)	2,4 – 2,6	1,2 – 2,0
<b>Minerales</b>		
Boro (µg)	30	28
Calcio (mg)	250	200 – 250
Cloro (mg)	600 – 800	400 – 450
Cobre (mg)	0,5 – 0,8	0,1 – 0,3
Cromo (µg)	17	25 – 75
Flúor (µg)	5 – 20	4 – 15
Fósforo (mg)	120 – 160	120 – 140
Iodo (µg)	40 – 50	140 – 150
Magnesio (mg)	30 – 35	30 – 35
Manganeso (µg)	5 – 12	3 – 4
Potasio (mg)	600 – 700	400 – 550
Selenio (µg)	235 – 32	10 – 25
Sodio (mg)	300 – 400	150 – 250
Zinc (mg)	5 – 12	1 – 3

(Modificado de Donovan 2008)

### II.2.2.1.1. Componentes nutricionales

#### II.2.2.1.1. a. Macronutrientes

La leche materna es un fluido muy complejo compuesto por glúcidos, lípidos, proteínas, vitaminas, nucleótidos y diversos compuestos bioactivos. La concentración media de los componentes principales de la leche madura es de aproximadamente 6,7 a 7,8 g/100 mL de lactosa, 3,2 a 3,6 g/100 mL de lípidos y 0,9 a 1,2 g/100 mL de proteína (Ballard, Morrow 2013, Gidrewicz, Fenton 2014).

#### *Carbohidratos*

Una gran variedad de diferentes y complejos carbohidratos están presentes en la leche. La lactosa, un disacárido formado por una molécula de glucosa y una galactosa mediante un enlace glicosídico  $\beta$  (1-4), es el carbohidrato predominante y su concentración en la leche es la menos variable de los macronutrientes (Ballard, Morrow 2013). De hecho, si comparamos con otras especies de mamíferos, en el humano encontramos la concentración más alta de este disacárido (llegando a 7 g/100 mL de leche en humanos en comparación con los 4,6 g/100 mL en leche de vaca) (Grenov et al. 2016). Esta abundancia corresponde a la alta demanda energética que tiene el cerebro humano (Andreas et al. 2015). La lactosa supone el 40% de la carga energética de la leche humana para el lactante (Grenov et al. 2016). Una vez hidrolizada la molécula por la lactasa, ambos monosacáridos son fácilmente absorbibles en el intestino. La glucosa es de uso directo por el organismo mientras que la galactosa debe ser transformada en glucosa en el hígado. Además de fuente de energía, la galactosa es el principal componente de los oligosacáridos. Mediante galactosilación esta molécula puede ser incorporada en glicoproteínas y glicolípidos, que tienen multitud de funciones en el desarrollo del lactante.

La lactosa, de manera normal, es metabolizada por completo. Sin embargo, si la actividad de la lactasa es baja, esta llega hasta el colon donde es fermentada por la microbiota intestinal, especialmente bifidobacterias y lactobacilos, que son productores de ácidos grasos de cadena corta (SCFA). En este caso, la lactosa puede considerarse como prebiótico, siempre y cuando la cantidad no sea capaz de producir problemas intestinales como diarrea osmótica, disminución del pH o irritación de la mucosa. En niños prematuros se estima que entre el 50 y el 70% de la lactosa ingerida llega al colon sin hidrolizarse. En niños a término tampoco se metaboliza su totalidad, aunque el porcentaje es mayor (Grenov et al. 2016).

#### *Oligosacáridos de leche humana*

Los oligosacáridos de leche humana (HMOs, del inglés *Human Milk Oligosaccharides*) son glicanos complejos no conjugados presentes en leche, en concentraciones que oscilan entre 0,5 - 2,3 g/100 mL en la leche madura (Goehring et al. 2014) e incluso mucho mayores en calostro (Bode 2015).

Se han encontrado más de 200 HMOs diferentes en la leche, siendo la leche humana, siendo la leche humana la que mayor número de ellos presenta en comparación con las demás especies de mamíferos (Hennet, Borsig 2016).

Estructuralmente, los HMOs están formados por hasta 12 residuos de monosacáridos de galactosa (Gal), glucosa (Glc), N-acetylglucosamina (GlcNAc), fucosa (Fuc) y ácido siálico (Sia). Todos los HMOs tienen lactosa en el final reducido. La fucosilación de los HMOs está relacionada con los antígenos sanguíneos de Lewis (Bode 2015) formándose diferentes patrones que están relacionados con variaciones genéticas en las madres (Blank et al. 2012, Stam et al. 2013).

Una vez ingeridos por el lactante, los HMOs resisten el pH bajo del estómago y la degradación por las enzimas pancreáticas. Aproximadamente el 1% de estos HMOs ingeridos son absorbidos y pasan a la circulación sistémica del niño, para excretarse intactos en orina. Desde que son absorbidos y aparecen en orina, por la circulación sistémica pueden aparecer en diversas localizaciones, como el hígado y el cerebro y los tractos respiratorio y urinario, pudiendo desempeñar funciones en estas dianas y explicando parte de los efectos beneficiosos de estos glicanos (Bode 2015). Los mamíferos carecen de la maquinaria enzimática necesaria para la degradación de estas estructuras en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, sí que pueden ser consumidos por algunos tipos de bacterias (Hennet, Borsig 2016).

Diversos estudios recientes sugieren que los HMOs pueden estar implicados en el efecto protector atribuido a la lactancia materna exclusiva y describen los siguientes mecanismos de acción como responsables del efecto beneficioso:

- 1) Actúan como prebióticos, seleccionando poblaciones bacterianas beneficiosas en el intestino, en especial a las especies del género *Bifidobacterium* (Bode 2015, Wickramasinghe et al. 2015, Collins, Reid 2016, Karav et al. 2016). Recientes estudios han determinado que no solo afectan a la composición de la microbiota intestinal, sino que son capaces de modificar la microbiota de la leche en la glándula mamaria (Aakko et al. 2017).
- 2) Recubren las superficies mucosas y funcionan como receptores análogos para los patógenos (Bode 2015).
- 3) Tienen actividad antimicrobiana (Andreas et al. 2015, Bode 2015).
- 4) Proveen al niño de factores esenciales para el desarrollo cognitivo (Goehring et al. 2014).
- 5) Interactúan con las proteínas del epitelio y de las células inmunitarias, modulando directamente la maduración del epitelio y la respuesta del SI (Bode 2015, Tundup et al. 2015).

### Lípidos

Los lípidos están compuestos por un 98% de Triacilglicéridos (TG) y un 2% de diacilglicéridos, monoacilglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y colesterol principalmente en forma de emulsión en la leche (Andreas et al. 2015, Delplanque et al. 2015, Kumar et al. 2016a). Estos compuestos están vehiculados en los llamados glóbulos de grasa, formados por una membrana de fosfolípidos en su mayoría, colesterol esterificado, polipéptidos glicosilados, mucinas y lactoadhesinas; y un núcleo de TG. Su diámetro oscila entre 1  $\mu\text{m}$  y 10  $\mu\text{m}$ , siendo el tamaño medio 4  $\mu\text{m}$  (Andreas et al. 2015). La estructura del glóbulo de grasa y el tipo de lípidos que se encuentran en la membrana influyen en su digestión y absorción. La leche contiene alrededor de 200 ácidos grasos diferentes, aunque la gran mayoría de ellos solo en cantidades ínfimas (Andreas et al. 2015). En la leche madura se encuentra entre un 34% y un 47% de ácidos grasos saturados, principalmente ácido palmítico, un 31 - 43% de ácidos grasos monoinsaturados, un 12-16% de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, del inglés *Poli Unsaturated Fatty Acid*)  $\omega 6$  y 0,8-3,6% de PUFA  $\omega 3$  (Delplanque et al. 2015).

La composición en ácidos grasos de los TG presentes en la leche humana está relacionada con sus propiedades y funciones. Se cree que son funciones de los lípidos presentes en la leche la de aporte energético al lactante, suponiendo entre el 40 y el 50% de la energía total aportada por la leche humana, de modulación de la función gastrointestinal, estar implicados en el metabolismo de las lipoproteínas, conformación de membranas celulares, componentes de rutas de señalización, acción antimicrobiana y están relacionados con el desarrollo visual y cognitivo del lactante (Delplanque et al. 2015, Andreas et al. 2016). Se estima que a los 6 meses de vida un lactante ha podido consumir un total de 5,5 kg de grasas totales (Delplanque et al. 2015).

### Proteínas

La leche humana contiene alrededor de 400 tipos diferentes de proteínas que se pueden clasificar en tres grupos: las caseínas, las procedentes del suero y las mucinas. Entre el 80-90% de las proteínas son producidas por el epitelio mamario y el resto son transportadas por el epitelio desde la circulación sistémica materna hasta la leche por transcitocis (Andreas et al. 2015) (**Fig. 6**).

La albúmina sérica es la proteína en mayor proporción. Como sus funciones en leche son similares a las que tiene en sangre se cree que no se sintetiza en la glándula mamaria, sino que es trasvasada de la circulación materna hasta la leche. Es fuente de aminoácidos para el lactante, y se une a multitud de ligandos, como cinc, cobre y tiroxina. Las uniones con estos ligandos son débiles y se rompen en su paso por el intestino, por lo que su principal función es la nutricional (Lonnerdal et al. 2016).

La  $\alpha$ -lactoalbúmina es una proteína sérica digerible que se representa entre el 25 y el 35% de la proteína de la leche. Tiene varias funciones fisiológicas en el desarrollo del lactante más allá de su papel de fuente de aminoácidos esenciales. Se une al calcio, al hierro y al cinc, y tiene cierta capacidad para inhibir el crecimiento de patógenos potenciales. Parte de sus funciones se atribuyen a los péptidos con actividad antibacteriana liberados tras su digestión en partes altas del tracto gastrointestinal. La concentración de  $\alpha$ -lactoalbúmina es mayor en calostro (4,30 mg/mL) y va disminuyendo a lo largo de la lactación a partir de las 2 semanas post-parto hasta valores cercanos a 2,6 mg/mL en leche madura (Lonnerdal et al. 2016).

Existen tres tipos de caseínas en la leche humana:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\kappa$ -caseína. La  $\kappa$ -caseína estabiliza a las otras dos caseínas, que son insolubles, formando una suspensión coloidal. Las caseínas componen el 13% de la fracción proteica (Andreas et al. 2015, Andreas et al. 2016) y se les atribuye cierta actividad antimicrobiana (Lonnerdal et al. 2016). Los fosfopéptidos son derivados de las caseínas con carga negativa que pueden quelar el calcio de la leche, facilitando así su absorción por el lactante. Otros péptidos derivados de las caseínas, las caseomorfinas, tienen una estructura similar a los péptidos opioides y se cree que intervienen en el desarrollo psicomotor además de afectar a los ciclos de sueño del lactante.

Los niveles de proteína total en leche disminuyen a lo largo del tiempo. Esta disminución es menor en leche de madres con partos prematuros, que en general tienen una mayor fracción proteica (Gidrewicz, Fenton 2014). Los niños prematuros tienen una mayor demanda de estos compuestos, por lo que cuando son alimentados con leche donada, que por lo general es leche madura, debe ser suplementada para cubrir sus necesidades (Ballard, Morrow 2013).

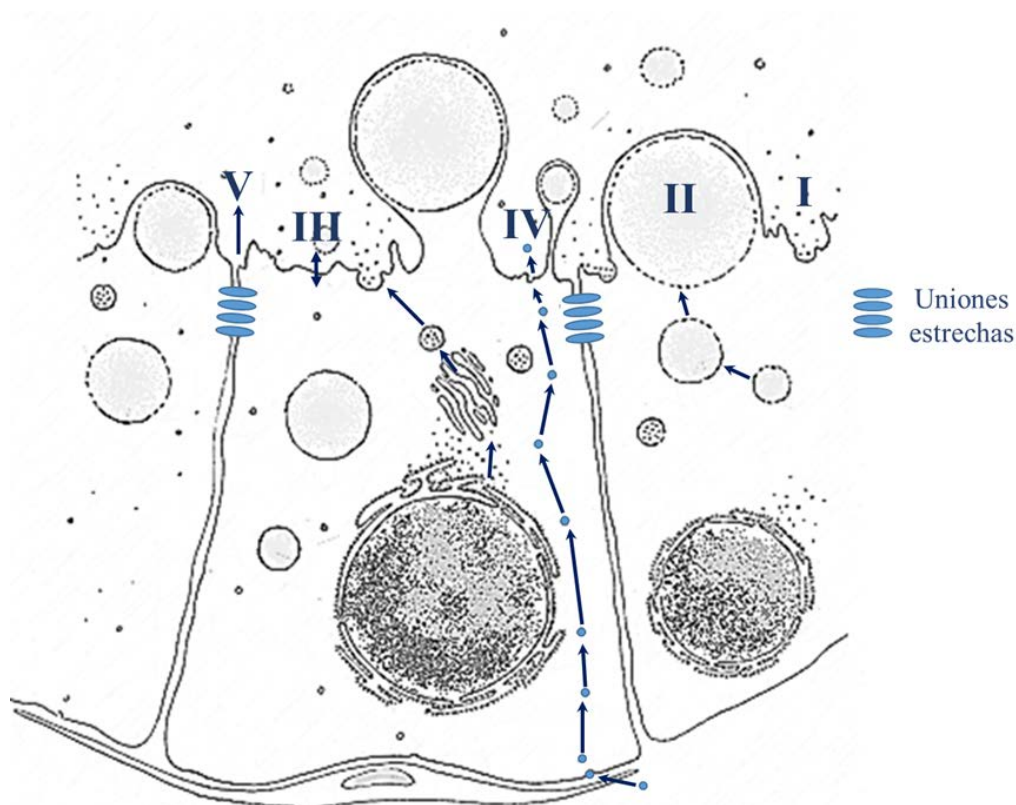
Además, la leche humana contiene una fracción de nitrógeno no proteico que consiste en moléculas bioactivas como la urea, ácido úrico, creatinina, nucleótidos, aminoácidos y péptidos, comprometiendo el 25% del nitrógeno total de la leche humana (Ballard, Morrow 2013, Andreas et al. 2015). Algunas de estas moléculas, como los nucleótidos, son considerados nutrientes esenciales en momentos tempranos de la vida y actúan de manera clave en diferentes procesos celulares. Más aún, los nucleótidos son conocidos por ser beneficiosos para el desarrollo, maduración y reparación del tracto gastrointestinal, el desarrollo de la microbiota y la función inmunológica (Andreas et al. 2015).

#### II.2.2.1.1.b. Micronutrientes

Muchos de los micronutrientes de la leche dependen de la dieta de madre (tiamina, riboflavina, vitamina B6, B12, colina, vitamina A, vitamina D, vitamina E, selenio y yodo) mientras que otros (folato, calcio, cobre y cinc) proceden de las reservas corporales de la madre y su concentración en la leche

varía poco con su ingesta (Allen 2012). De manera que durante la lactancia se recomienda la suplementación materna con estos micronutrientes.

Existen otros compuestos, llamados bioactivos, que son sustancias no nutritivas que afectan a los procesos fisiológicos y que, en consecuencia, tienen un profundo impacto en la supervivencia y la salud del neonato. Las sustancias bioactivas de la leche pasan a la circulación del lactante mediante 6 mecanismos diferentes: (i) la leche humana y en especial el calostro, tienen alta concentración de  $\alpha 1$ -antitripsina, un potente inhibidor de la actividad proteasa que protege la digestión de estas sustancias; (ii) el tracto gastrointestinal del lactante favorece la absorción de estos compuestos gracias a su alto pH; (iii) la inmadurez del páncreas hace que su secreción enzimática sea limitada, favoreciendo la absorción de estos compuestos por resistencia a la proteólisis; (iv) existen en el tracto gastrointestinal receptores de adipoquinas; (v) la vía paracelular por difusión permite el paso para la absorción de péptidos sin su digestión; (vi) algunas moléculas de la leche humana, como los microRNA o miRNA, o células vivas pueden pasar directamente a la circulación sanguínea gracias a los exosomas (Bauman et al. 2006, Fields et al. 2016).



**Figura 6. Estructura de una célula alveolar de glándula mamaria lactante y las principales vías secretoras:** I, exocitosis; II, lípidos; III, transporte apical; IV, transcitosis; y V, vía paracelular. Las vías I, II, III, y IV se consideran las vías transcelulares, mientras que la V es considerada la vía paracelular.



## II.3. FACTORES INMUNOLÓGICOS

---

Al igual que en otros órganos, en la glándula mamaria se encuentran componentes del SI innato y adaptativo. El SI innato constituye la primera línea de defensa ya que no requiere de activación o esta ocurre de forma muy rápida (horas) y en él participan barreras físicas de las vías de entrada a la glándula mamaria y los epitelios; receptores de patrones de reconocimiento; células fagocíticas; lisozima y lactoferrina, anticuerpos de baja especificidad y otros factores solubles. Cuando una infección es controlada en sus primeros estadios (respuesta innata) no se aprecian cambios en la glándula mamaria a nivel macroscópico. En cambio, la activación de la respuesta adaptativa ante una infección, tiene lugar de manera secuencial, dada su complejidad y el alto grado de control que existe sobre la misma, haciéndose patente transcurridos varios días del momento de la infección. Esta reacción se caracteriza por la activación de la expansión clonal de linfocitos T y B; la producción de anticuerpos específicos frente al antígeno o antígenos del patógeno y la generación de memoria (Aitken et al. 2011).

El complemento es un componente del SI innato. Formado por una serie de proteínas que actúan en cascada, su concentración es mayor en calostro y durante la involución de la mama, debido a la relajación de las uniones estrechas. Su activación acaba en la generación de proteínas pro-inflamatorias, en especial el fragmento C5a, asociado a la mastitis. En las bacterias, estas proteínas son capaces de formar poros en sus membranas y eliminarlas. Además el complemento es un potente quimioatrayente de neutrófilos en los primeros momentos de la infección (Aitken et al. 2011).

### II.3.1. Células del SI de la madre en leche

Los leucocitos presentes en la leche materna llegan a la glándula mamaria a través del sistema linfático o el circulatorio y pasan al lumen del alveolo mamario por la vía paracelular. Las células inmunitarias que llegan a la glándula mamaria presentan mayor motilidad que las sanguíneas, sugiriendo que esta migración es selectiva; además, como se ha indicado, su proporción es diferente a la que se encuentra en la sangre, por lo que esta migración es también selectiva en las funciones.

Los macrófagos de la leche son capaces de afectar a la función de los linfocitos T y B del niño ya que presentan en su superficie marcadores de activación específicos, como el CD11c. Tienen actividad fagocítica y secretan citoquinas. Además, en su membrana tienen sIgA adherida, que puede ser liberada en el contacto con bacterias en el intestino (Field 2005). Los neutrófilos de leche humana presentan menor adherencia, polarización y motilidad y expresan altos niveles de CD11b y bajos de selectina-L, indicativo de una



activación previa. Parece que la principal función de estas células es la de proteger a la madre ya que su capacidad está mermada una vez que son secretados en la leche (Field 2005). Los linfocitos de la leche son, en su mayoría, linfocitos T y dentro de estos, la mayor proporción corresponde a los CD8<sup>+</sup>, que expresan selectina-L e integrina  $\alpha 4\beta 7$ , ambas moléculas relacionadas con su activación y migración. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> también están presentes de manera activada, expresando el marcador de memoria CD45RO<sup>+</sup>. Estos linfocitos activados maduros pueden ayudar a compensar la baja capacidad de presentación de antígeno de los macrófagos del neonato. La consecuencia funcional de estas células es que los niños alimentados con leche humana presentan un timo el doble de grande que aquellos alimentados con fórmula, apoyando el hecho de que la leche humana ayuda al desarrollo de los linfocitos T en el lactante (Field 2005, Chirico et al. 2008). Además, la leche conforma una sofisticada red de señalización que, actuando sobre la expresión de FoxP3 promueve la diferenciación y mantenimiento de las células T<sub>reg</sub>, de gran importancia en la supresión de alergias y la autoinmunidad, permitiendo un correcto desarrollo de la tolerancia oral en el periodo post-natal (Melnik et al. 2016).

Se ha sugerido que el estado de salud, tanto de la madre como del niño, puede influir en el contenido celular de la leche, revelando una conexión inmunológica madre-hijo. En estos casos de infección el número de leucocitos aumenta drásticamente, manteniéndose hasta la recuperación. Como ejemplo, madres con hijos hospitalizados con bronquiolitis tienen en leche un mayor número de leucocitos y además efectores frente el virus respiratorio sincitial, principal causante de esta enfermedad (Hassiotou, Geddes 2015). Estos leucocitos ejercen su acción vía fagocitosis, secretando sustancias antimicrobianas, citoquinas e inmunoglobulinas, actuando tanto en el tracto gastrointestinal como en sitios lejanos, ya que alcanzan la circulación sanguínea y viajan por todo el organismo del lactante.

### II.3.2. Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas (Ig's), o anticuerpos, presentes en el calostro y en la leche son parte de la inmunidad pasiva que la madre pasa al neonato, ya que resisten el paso por el tracto gastrointestinal. En el caso del calostro, las Ig's están en una mayor concentración para ir disminuyendo su concentración, en especial debido al cierre de las uniones estrechas del epitelio mamario y el paso a leche madura (Stelwagen, Singh 2014). Esta reducción de la concentración viene acompañada por una maduración del SI del neonato y a un aumento de la impermeabilidad del epitelio intestinal al paso de este tipo de proteínas. Las que presentan unas concentraciones más altas son la IgA en su forma secretada (sIgA) seguida de la IgM e sIgG.

La sIgA se postula como el primer agente protector de la leche humana, no así en las demás especies de mamíferos (Hurley, Theil 2011). Existen dos subclases de IgA, siendo la subclase IgA<sub>2</sub> la presente en la leche humana, producida de manera local en la glándula mamaria (Agarwal et al. 2011). En calostro, su concentración media es de 12 mg/mL y se reduce gradualmente hasta 1 mg/mL, en leche madura. Esta Ig no parece pasar a la circulación sistémica del neonato, excepto en el caso de prematuros, sugiriendo que su efecto se restringe a las superficies mucosas del tracto gastrointestinal del niño nacido a término (Andreas et al. 2015) evitando la translocación de antígenos del lumen intestinal e impidiendo la sobre-estimulación de las células T por antígenos del ambiente, ayudando a la tolerancia oral del neonato (Cabinian et al. 2016).

La IgM es también detectada en calostro y leche aunque en menor proporción que la IgA, siendo su concentración al comienzo de la lactación de unos 0,12 mg/mL (Andreas et al. 2015). Esta Ig es considerada como la respuesta primaria de anticuerpos, producida por los linfocitos B activados (Agarwal et al. 2011). Al nacimiento, el neonato es capaz de sintetizar IgM en respuesta a infección, lo que puede explicar el menor contenido de esta Ig en calostro y cómo va disminuyendo en el tiempo en leche.

La IgG está presente en leche en todas sus isoformas: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>, siendo la Ig que se encuentra en menor concentración tanto en calostro como en leche, aunque sus niveles tienden a aumentar en leche madura, ya que la producción de IgG por el neonato no comienza a ser efectiva hasta el sexto mes de vida. Este hecho contrasta con el descenso en la concentración en leche de IgA que coincide con la maduración y evolución del SI del lactante que será capaz de responder de forma activa por si mismo. Es por todo esto, que, para procurar la protección del lactante es recomendable la lactancia materna exclusiva durante los 6 primeros meses de vida (Expert Consultation on Evaluation of Health FAO/WHO 2001, Section on Breastfeeding 2012).

### II.3.3. Citoquinas y quimioquinas

La respuesta inmunitaria frente a virus y bacterias es mediada por el SI innato y adaptativo; ambos mediados por las citoquinas, que entablan una comunicación entre las diferentes células implicadas en esta respuesta (Garofalo 2010).

Las citoquinas son moléculas de señalización, que pueden ser secretadas por células epiteliales mamarias y por las células del SI presentes en la leche. Incluyen a las quimioquinas, que causan la quimiotaxis de células diana cercanas; las interleuquinas, con variedad de funciones; y los interferones y factores hematopoyéticos que promueven la proliferación de los leucocitos. Se trata de péptidos con actividad autocrina y paracrina que, una vez que alcanzan el intestino del lactante, son capaces de cruzar la barrera intestinal y “comunicarse” con las células inmunitarias del lactante para modular su actividad inmunológica (Ballard, Morrow 2013).

Las citoquinas operan en redes y producen una cascada de efectos que contribuyen a la orquestación, desarrollo y a correcta funcionalidad del SI del neonato (Garofalo 2010).

Hasta la fecha, se ha descrito la presencia de más de 60 citoquinas diferentes en leche materna (Kverka et al. 2007). Esto es de gran importancia, ya que la producción de citoquinas está disminuida en el neonato; entre ellas, interleuquinas como la IL-3, -4, -5, -8 y -10; IFN $\gamma$  y algunos factores hematopoyéticos, lo que resulta en una inmadurez de la respuesta inmunitaria a varios niveles. Durante la lactancia, las funciones biológicas de las citoquinas, cuya producción está retrasada en el neonato, es reemplazada por las que vehicula la leche humana y que van a llegar activas al intestino del lactante, debido a la existencia de distintos mecanismos de protección, tanto en la leche como en el tracto gastrointestinal del lactante (Chirico et al. 2008, Garofalo 2010) siendo capaces de interactuar con la mucosa y con los tejidos linfoides (Maheshwari et al. 2011).

Diversos estudios han mostrado que las citoquinas presentes en la leche materna ejercen funciones beneficiosas para la glándula mamaria además de para el desarrollo del neonato. Por ejemplo, la IL-6 y el TNF- $\alpha$  están relacionadas con los procesos de inflamación y de regulación del desarrollo y de las funciones de la glándula mamaria mientras que la IL-1, el INF- $\gamma$ , están implicadas en la producción de agentes de defensa como la sIgA y otras citoquinas por la glándula mamaria (Garofalo 2010); de hecho, en el caso de mastitis, se ha detectado un aumento en los niveles de IL-6 e IL-8. En este mismo sentido, las CXCL, en especial la IL-8, son potentes activadores y reclutadores de neutrófilos y están presentes en grandes cantidades en leche humana. Los factores hematopoyéticos como el M-CSF juega un papel importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia de los macrófagos en leche humana, activando funciones antiinflamatorias (Garofalo 2010).

Con respecto al papel de las citoquinas de la leche materna en el desarrollo y maduración del intestino infantil y de su sistema inmunitario, se ha demostrado que el G-CSF tiene efectos beneficiosos en el desarrollo del epitelio intestinal incrementando las microvellosidades, la profundidad de las criptas y estimulando la proliferación. También se ha descrito que la IL-10 y el TGF- $\beta$  son claves en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, favoreciendo la presentación de antígenos y la tolerancia oral (Konkel, Chen 2011) y regulando la respuesta inmunitaria en el intestino del neonato (Penttila 2010a). En este contexto, algunas citoquinas reguladoras, como la IL-7, son capaces de cruzar la barrera intestinal y participar así en el desarrollo del timo en el lactante (Ballard, Morrow 2013). Otras como el INF- $\gamma$  favorecen la respuesta Th1 inhibiendo la Th2, relacionada con la respuesta frente a alergias (Ballard, Morrow 2013).

Se ha determinado que de las 3 isoformas del TGF- $\beta$ , la TGF- $\beta$ 2 es la principal en leche humana (Ballard, Morrow 2013) e interviene en el balance Treg - Th17, en la producción de IgA y en la generación de linfocitos intra-epiteliales (Maheshwari et al. 2011).

En definitiva, la leche tiene un efecto inmuno-protector debido a la presencia de citoquinas con carácter anti-inflamatorio y a la escasa concentración de citoquinas pro-inflamatorias (Fields et al 2016).

## II.4. MICROBIOTA Y MICROBIOMA DE LA LECHE HUMANA

---

### II.4.1. Estudios basados en las técnicas de cultivo

Los primeros estudios sobre los microorganismos presentes en la leche humana se llevaron a cabo durante la segunda mitad del siglo pasado y se centraron principalmente en la detección de microbios "contaminantes" y/o potencialmente patógenos, y su posible papel como agentes de infecciones infantiles (Rantasalo, Kauppinen 1959, Foster, Harris 1960, Kenny 1977, Williamson et al. 1978, Eidelman, Szilagyi 1979). Aunque se han descrito algunos casos de infecciones infantiles y sepsis asociados con la transmisión de patógenos a través de la leche humana (Qutaishat et al. 2003, Kayiran et al. 2014, Weems et al. 2015, Zimmermann et al. 2017), la presencia de microorganismos en este fluido biológico no es considerada como un predictor del riesgo de infección (Boer et al. 1981, Schanler et al. 2011, Zimmermann et al. 2017).

En los últimos 15 años, varios grupos de investigación han puesto de manifiesto la presencia de bacterias comensales, mutualistas o potencialmente probióticas en la leche humana en condiciones fisiológicas (Fernández et al. 2013b), lo que ha provocado un creciente interés por conocer su microbiota y microbioma y sus posibles funciones para la salud materna y/o infantil.

En general, la microbiota de la leche humana parece estar dominada por bacterias Gram-positivas pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* (Jiménez et al. 2008a, Solís et al. 2010, Schanler et al. 2011, Fitzstevens et al. 2017). No obstante, también se pueden aislar con cierta frecuencia diversas bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*...) y bifidobacterias (Martín et al. 2003, Abrahamsson et al. 2009, Martín et al. 2009, Solís et al. 2010, Murphy et al. 2016). Entre ellos, algunas especies de los géneros *Lactobacillus* (*L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*...) y *Bifidobacterium* (*B. longum*, *B. breve*,...) han sido objeto de particular interés debido a su potencial como bacterias probióticas. Globalmente, se han aislado más de 200 especies bacterianas diferentes, pertenecientes a aproximadamente 50 géneros, a partir de este fluido biológico (Fernández et al. 2013b), incluyendo nuevas especies bacterianas, como *Streptococcus lactarius* (Martín et al. 2011).

La concentración bacteriana en la leche humana puede oscilar entre  $10^1$  y  $10^6$  ufc/mL, dependiendo del estado de salud de la madre (sana, mastitis respectivamente) y, también, del método de recolección de la muestra. A modo de ejemplo, el uso de bombas puede dar como resultado la presencia de una elevada concentración de bacterias Gram-negativas (*Enterobacterias*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*...) y levaduras como consecuencia de su presencia en el agua de lavado o aclarado de las mismas o de prácticas de manipulación poco higiénicas (Jiménez et al. 2017).

<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	Otras BAL <sup>a</sup>	<i>Bifidobacterium</i>	Otras Gram +	Bacterias Gram-
<i>S. aureus</i>	<i>St. australis</i> ,	<i>L. acidophilus</i>	<i>E. durans</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Act. odontolyticus</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>S. capitis</i>	<i>St. bovis</i>	<i>L. animalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>S. epidermidis</i>	<i>St. gallolyticus</i> ,	<i>L. brevis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. breve</i>	<i>Cor. aurimucosum</i>	<i>Burkholderia multivorans</i>
<i>S. hominis</i>	<i>St. mitis</i>	<i>L. crispatus</i>	<i>E. hirae</i> ,	<i>B. catenolatum</i>	<i>Cor. coyleae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>S. xylosum</i>	<i>St. oris</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>E. mundtii</i> ,	<i>B. infantis</i>	<i>Cor. pseudogenitalium</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. haemolyticus</i>	<i>St. parasanguis</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Gemella haemolysins</i>	<i>K. milletii</i>
<i>S. lugdunensis</i>	<i>St. lactarius</i>	<i>L. gastricus</i>	<i>Lc. citreum</i>		<i>Kocuria kristinae</i>	<i>K. oxytoca</i>
	<i>St. salivarius</i>	<i>L. paraplantarum</i>	<i>Lc. fallax</i>		<i>Kocuria rhizophila</i>	<i>K. pneumoniae</i>
	<i>St. infantis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>Lc. mesenteroides</i>		<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
	<i>St. peroris</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>P. pentosaceus</i>		<i>Paenibacillus</i> spp.	<i>Ps. pseudocaligenes</i>
	<i>St. vestibularis</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Weissella cibaria</i>		<i>Peptostreptococcus</i> spp.	<i>Ps. synxanthia</i>
		<i>L. salivarius</i>	<i>Weissella confusa</i>		<i>Pr. acnes</i>	<i>Ralstonia</i> spp., <i>S. proteamaculans</i>
		<i>L. vaginalis</i>			<i>Pr. granulorum</i>	<i>Sphingomonas</i> spp.
					<i>Rothia mucilaginosa</i>	

<sup>a</sup>Abreviaturas: BAL: bacterias lácticas; *Act.*: Actinomyces; *Cor.*: Corynebacterium; *E.*: Enterococcus; *K.*: Klebsiella; *L.*: Lactococcus; *Lc.*: Leuconostoc; *P.*: Pediococcus; *Pr.*: Propionibacterium; *Ps.*: Pseudomonas; *S.*: Serratia; *St.*: Streptococcus.

Los métodos dependientes de cultivo tienen la limitación de no poder evaluar la presencia de microorganismos viables pero no cultivables pero, en cambio, permiten el aislamiento, la conservación y la caracterización de las cepas, incluyendo la secuenciación de los genomas de un número creciente de aislados (Lara-Villoslada et al. 2007, Jiménez et al. 2008a, Delgado et al. 2009a, Jiménez et al. 2010, Martín et al. 2010, Arboleya et al. 2011, Delgado et al. 2011, Gueimonde et al. 2012, Jiménez et al. 2012, Langa et al. 2012, Martín et al. 2012b, Martín et al. 2012a, Cárdenas et al. 2014, Cárdenas et al. 2015, Martín et al. 2016b, Mediano et al. 2017, Marín et al. 2017).

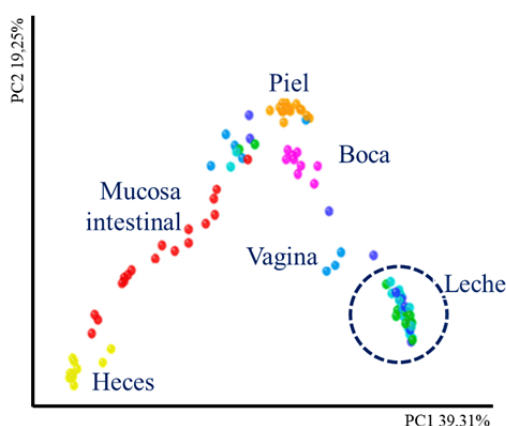
En resumen, el uso de métodos de cultivo ha demostrado que la leche humana representa un nicho ecológico complejo y una fuente de cepas con potencial probiótico. Además, no se debe olvidar que la leche humana puede portar levaduras, mohos, arqueas y virus (Daudi et al. 2012, Liu et al. 2015, Dupont-Rouzeyrol et al. 2016, Mutschlechner et al. 2016) (**Tabla 2**). La transmisión de tres virus específicos (Citomegalovirus (CMV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus linfotrópico de células T humano Tipo I (HTLV-I)) al lactante a través de la lactancia materna es motivo de especial preocupación y se tiene en cuenta la gestión de los bancos de leche humana. La leche humana también puede contener bacteriófagos que podrían desempeñar un papel relevante en la modulación de la microbiota presente en la misma (Jiménez et al. 2015, Duranti et al. 2017a).

**Tabla 2. Principales géneros y especies bacterianas aisladas de leche humana o cuyo DNA ha sido detectado en este fluido.**

Por otra parte, este ecosistema contiene una compleja población de células epiteliales y del SI (Fan et al. 2010, Hassiotou, Geddes 2015, Nuriel-Ohayon et al. 2016, Witkowska-Zimny, Kaminska-El-Hassan 2017), con potencial para interactuar con los microorganismos.

#### II.4.2. Estudios basados en las técnicas independientes de cultivo

Los microorganismos cultivables únicamente representan una fracción de las comunidades microbianas que habitan en un nicho ecológico específico. Por lo tanto, la aplicación de diferentes técnicas moleculares independientes de cultivo, incluida la PCR cuantitativa, la PCR combinada con la electroforesis en gel de gradiente desnaturante (DGGE, del inglés *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y las técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*), ha proporcionado una evaluación complementaria del microbioma de la leche humana (Jeurink et al. 2013, McGuire, McGuire 2015). Es importante tener en cuenta que estas técnicas detectan ácidos nucleicos y no células microbianas vivas, lo que significa que el ADN detectado o secuenciado puede pertenecer a organismos vivos o muertos. Otras limitaciones y sesgos que las técnicas moleculares pueden introducir en la evaluación de comunidades microbianas complejas incluyen una sobre- o subestimación de algunos grupos microbianos debido a diferencias en la composición sus paredes celulares, membranas externas o membranas plasmáticas, a los métodos de extracción de ADN, al número de copias del gen diana, a la(s) región(es) del gen 16S rRNA a las que estén dirigidos los cebadores seleccionados y a las limitaciones actuales en lo referente al análisis bioinformático (Lagier et al. 2012, McGuire, McGuire 2015, Gómez-Gallego et al. 2016, McGuire McGuire 2017) (**Fig. 7**).



**Figura 7. PCA de la relación entre las bacterias de la leche y el resto del microbioma humano.** Ejemplo del empleo del gen 16S. El gráfico muestra el análisis de componentes principales de la composición bacteriana de la leche y del calostro en comparación con las secuencias femeninas adultas disponibles de la misma región del gen 16S (regiones hipervariables V1 y V2) de la piel, la vagina, las heces, la mucosa intestinal y epitelio oral. Modificado de Cabrera-Rubio et al. 2012.

Globalmente, los estudios independientes de cultivo han confirmado la presencia de ADN de géneros bacterianos previamente identificados con técnicas dependientes del cultivo, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Bifidobacterium* y/o *Lactobacillus* spp. (Martín et al. 2007b, Martín et al. 2007a, Gueimonde et al. 2007, Delgado et al. 2008, Collado et al. 2009, Hunt et al. 2011, Cabrera-Rubio et al. 2012, Ward et al. 2013, Jost et al. 2013, Jost et al. 2014,



Jiménez et al. 2015, Boix-Amorós et al. 2016, Cabrera-Rubio et al. 2016, Fitzstevens et al. 2017). Además, algunos de ellos también han descrito la presencia de ADN perteneciente a microorganismos estrictamente anaerobios asociados al intestino (*Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Veillonella*, ...), que, o bien son no cultivables, o son muy difíciles de cultivar en el laboratorio y, por lo tanto, no se habían podido detectar previamente utilizando medios de cultivo (Cabrera-Rubio et al. 2012, Jost et al. 2013, Jost et al. 2014, Jiménez et al. 2015, Gómez-Gallego et al. 2016).

Los estudios microbiológicos centrados en la leche humana o en el tejido mamario también han revelado la presencia de secuencias pertenecientes a un tercer grupo de géneros bacterianos típicamente asociados al suelo y el agua, incluyendo *Acinetobacter*, *Bradyrhizobium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Novosphingobium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Sphingopyxis*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* y *Xanthomonas* (Hunt et al. 2011, Cabrera-Rubio et al. 2012, Urbaniak et al. 2014b, Urbaniak et al. 2014a, Li et al. 2017a). En algunos trabajos, las secuencias de ADN relacionadas con tales microorganismos fueron tan frecuentes y abundantes que algunos de ellos se consideraron miembros del "*microbioma común (core)*" de la leche humana. Sin embargo, conviene tener presente que el estudio de microbiomas con baja abundancia (como el de la leche humana) mediante técnicas moleculares posee una elevada susceptibilidad a los falsos positivos debido a la presencia de ADN contaminante en los reactivos de PCR, en los *kits* de extracción de ADN y en el agua de grado molecular (Grahm et al. 2003, Muhl et al. 2010, Laurence et al. 2014, Salter et al. 2014, Lauder et al. 2016, Pérez-Muñoz et al. 2017). Este hecho puede conducir a resultados y conclusiones erróneas. Los futuros estudios deberán incluir blancos de control para determinar qué observaciones son realmente genuinas.

#### II.4.3. Factores que influyen en la composición de microbiota/microbioma de la leche humana

La composición cuantitativa y/o cualitativa de muchos componentes de la leche humana (péptidos, proteínas, lípidos, compuestos inmunológicos, oligosacáridos, etc.) puede estar influenciada por diversos factores, incluyendo el bagaje genético, la ubicación geográfica, la dieta, la fracción de la toma, la edad gestacional, el ritmo circadiano, o la etapa de lactancia entre otros (Quinn et al. 2012, Nishimura et al. 2014, Atiya Ali et al. 2014, Collado et al. 2015, Ares et al. 2016, Hoashi et al. 2016, Kumar et al. 2016b, Kunz et al. 2017, Bardanzellu et al. 2017, McGuire et al. 2017, Ruiz et al. 2017, Sprenger et al. 2017). Sin embargo, se sabe poco sobre la interacción y el impacto de estos y otros factores en las comunidades microbianas de la leche humana (Fernández et al. 2014b, Gómez-Gallego et al. 2016). Las posibles variaciones en la composición de la microbiota de la leche pueden tener



implicaciones biológicas para la colonización y el metabolismo del lactante y para el desarrollo y maduración de los sistemas inmunitario y neuroendocrino.

Los oligosacáridos de la leche humana (HMOs) parecen estimular el crecimiento de grupos bacterianos específicos que se encuentran con frecuencia en la leche humana y en las heces de los lactantes, como *Staphylococcus epidermidis* o *Bifidobacterium* spp. (Hunt et al. 2012, Thongaram et al. 2017). Recientemente se han descrito diversas asociaciones entre los microbios de la leche y el perfil de HMOs, las células de la leche humana y/o sus macronutrientes (Lewis et al. 2015, Wang et al. 2015, Boix-Amoros et al. 2016, Aakko et al. 2017, Williams et al. 2017b, Williams et al. 2017a).

Igualmente, cada día son más numerosos los estudios que investigan los efectos de una amplia gama de factores en los perfiles de microbiota/microbioma de la leche humana. Entre esos factores se incluyen la edad gestacional, la ubicación geográfica, el período posparto, el modo de nacimiento, la dieta materna, el estado de salud materna (salud, mastitis, síndrome metabólico, obesidad, alergias, enfermedad celíaca, mujeres VIH-positivas), tratamientos médicos (antibióticos, quimioterapia) y uso de bombas y otros dispositivos para la recolección de las muestras (Gronlund et al. 2007, Albesharat et al. 2011, Hunt et al. 2011, Cabrera-Rubio et al. 2012, Collado et al. 2012, Soto et al. 2014, González et al. 2013, Khodayar-Pardo et al. 2014, Urbaniak et al. 2014b, Cabrera-Rubio et al. 2016, Hoashi et al. 2016, Dave et al. 2016, Sakwinska et al. 2016, Li et al. 2017b, Gómez-Gallego et al. 2017, Williams et al. 2017a, Boix-Amoros et al. 2017, Jiménez et al. 2017). Algunos de estos estudios encontraron diferencias significativas entre los grupos comparados, mientras que otros no encontraron cambios relevantes. También se han descrito resultados contradictorios cuando diferentes grupos de investigación han comparado el efecto de un mismo factor sobre el microbioma de la leche humana.

Por lo tanto, aunque resulta evidente que el microbioma de la leche humana está influenciado por varios factores y que, a su vez, esta microbiota puede ejercer una fuerte influencia en otros componentes de la leche, los factores desencadenantes o determinantes de las diferencias en la composición de la microbiota/microbioma de este fluido son francamente desconocidos y tendrán que ser dilucidados en estudios futuros. En este sentido, se requieren estudios internacionales que compartan criterios y protocolos comunes, desde el reclutamiento de las mujeres hasta el análisis bioinformático o bioestadístico de los datos. De esta manera, se podrán comparar los resultados obtenidos por distintos grupos y evaluar el impacto real de los factores citados anteriormente (McGuire, McGuire 2015, Gómez-Gallego et al. 2016, McGuire, McGuire 2017).

## II.5. MASTITIS

---

### II.5.1. Introducción

En los últimos años ha resurgido el interés por la lactancia materna debido a los efectos beneficiosos que tiene para la salud materno-infantil, la economía y el medioambiente de cualquier país, independientemente de su grado de desarrollo (Lawrence, Lawrence 2011, Renfrew et al. 2012). Tales beneficios han merecido el reconocimiento unánime por parte de todas las organizaciones nacionales e internacionales de los ámbitos de la salud, la pediatría, la ginecología, la nutrición, la infancia o la epidemiología, que consideran que la alimentación infantil no debe ser contemplada como una mera opción de estilo de vida sino como un problema básico de Salud Pública. En consecuencia, recomiendan la práctica de la lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida y su combinación con otros alimentos hasta al menos los dos años de vida si es deseo mutuo de la madre y el lactante (Expert Consultation on Evaluation of Health FAO/WHO 2001, Section on Breastfeeding 2012).

Sin embargo, en la práctica resulta complicado cumplir tales recomendaciones debido a diversas razones, principalmente de índole laboral y social (Li et al. 2008, McGuire 2011). Desde el punto de vista médico, las mastitis representan la primera causa de destete precoz no deseado (Walker, 2008), con una incidencia entre mujeres lactantes de hasta el 35% cuando se consideran todos los casos clínicos de mastitis, incluyendo agudos y subagudos (Delgado et al. 2009a, Delgado et al. 2009c, Michie et al. 2003, Jiménez et al. 2009). La mayoría de los casos se concentran en los tres primeros meses posparto (Khanal et al. 2015). Teniendo en cuenta que esta enfermedad puede impedir que muchas parejas madre-lactante reciban los beneficios que la lactancia materna proporciona a corto, medio y largo plazo, las mastitis deberían ser consideradas como un problema relevante para la Salud Pública; sin embargo, la realidad actual es que se trata de un problema infravalorado y que recibe una atención marginal por parte de los profesionales sanitarios.

El proceso de lactancia ha sido notablemente exitoso desde los primeros mamíferos, permitiendo que miles de especies ocupen una amplia gama de nichos ecológicos. Nuestras células humanas y los microorganismos que nos habitan han co-evolucionado durante milenios permitiendo el establecimiento de relaciones mutuamente beneficiosas en el tracto gastrointestinal (Round, Mazmanian 2009) y, muy probablemente, en la glándula mamaria y la leche.

En condiciones fisiológicas, la microbiota de la leche humana se caracteriza por un equilibrio dinámico entre diversas especies bacterianas. Algunas cepas bacterianas aisladas de la leche humana tienen la capacidad de

prevenir enfermedades infecciosas e inflamatorias, y se conocen como "*simbiontes*". Sin embargo, y de forma similar a lo que sucede en otras mucosas y epitelios humanos, la microbiota de leche "normal" también puede contener microorganismos "*patobiontes*", que bajo ciertas circunstancias que alteran dicho equilibrio (y que se tratarán posteriormente) pueden proliferar y actuar como patógenos oportunistas (Hornef 2015).

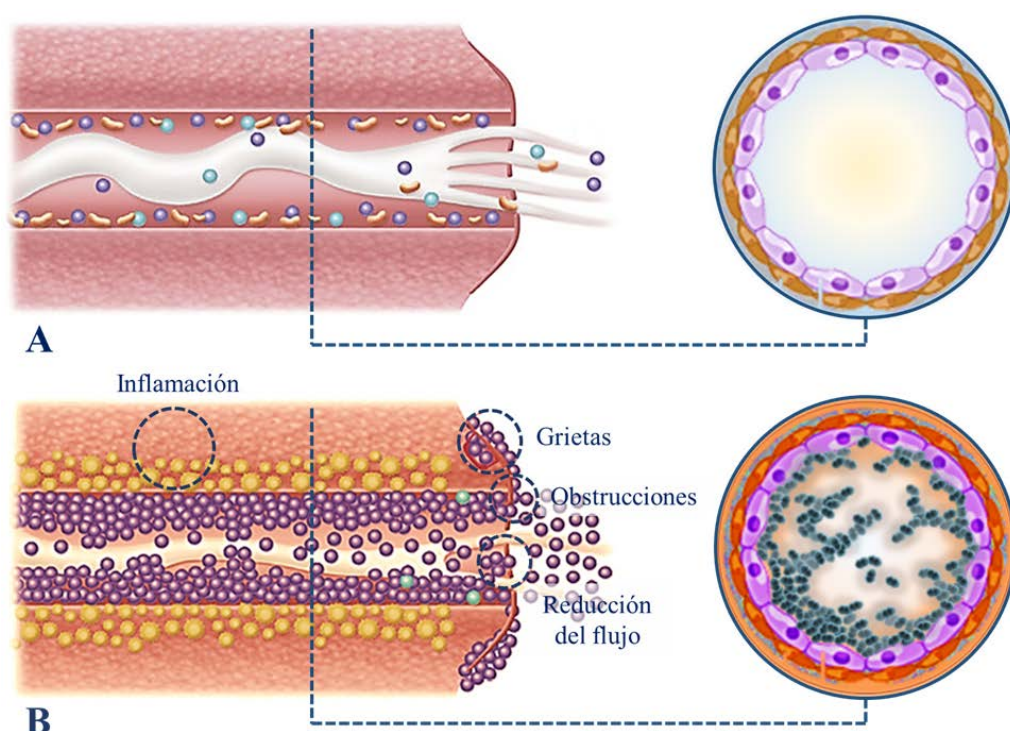
La Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (*US National Library of Medicine*) define "*disbiosis*" como aquellos "*cambios en la composición cuantitativa y cualitativa de la microbiota*" de un lugar determinado (MeSH Descriptor Data; ID: D064806). Tales cambios alteran las interacciones entre un hospedador y su microbiota y provocan un desequilibrio homeostático que, si es suficientemente intenso o se mantiene en el tiempo, puede conducir a un proceso infeccioso, con la consiguiente inflamación de los tejidos afectados.

Las evidencias científicas coinciden en señalar que las mastitis que se producen durante la lactancia son el resultado final de un proceso de disbiosis mamaria (**Fig. 8**), de forma análoga a lo que sucede en ciertos casos de disbiosis intestinales (gastroenteritis, enfermedades inflamatorias intestinales...) o vaginales (vaginitis, vaginosis...). En condiciones de disbiosis se produce un cambio en la composición de la microbiota, con una disminución de la diversidad bacteriana, una reducción cualitativa y cuantitativa de simbiontes y un aumento notable en la concentración de uno o más patobiontes. En general, se considera que un ecosistema es más resistente y tiene mayor capacidad de resiliencia frente a factores adversos cuanto más diversa sea su microbiota. Los estudios del microbioma intestinal ejemplifican la enorme influencia de un estilo de vida "occidentalizado" sobre la diversidad microbiana y la fisiopatología de muchas enfermedades. Factores tales como la forma de nacimiento, el tipo de alimentación durante la infancia, el nivel de higiene, la exposición a antibióticos y vacunas o la dieta, ejercen un gran impacto sobre la adquisición y evolución de la microbiota intestinal. Dado que la microbiota intestinal parece ejercer una fuerte influencia sobre la microbiota mamaria humana, el estilo de vida occidental también puede tener un impacto similar en la microbiota de la leche humana.

## II.5.2. Mastitis: definición y clasificación

Literalmente, mastitis significa "*inflamación de la mama*" pero, en la práctica, este término se utiliza generalmente para definir un proceso infeccioso de la glándula mamaria, que suele ocurrir -no siempre- durante la lactancia o el puerperio y que se acompaña de algunos síntomas (locales y, en algunos casos, sistémicos) característicos (Lawrence, Lawrence 2011). La naturaleza infecciosa de la mastitis lactacional generalmente sirve para diferenciarla de otros procesos inflamatorios de la glándula mamaria, como los asociados al

cáncer de mama, y también, de la enfermedad de Raynaud (caracterizada por una vasoconstricción periférica muy intensa que cursa con un dolor agudo en la zona afectada del pezón).



**Figura 8. Conductos galactóforos en condiciones normales (A) y en caso de padecer mastitis infecciosa (B).** En casos de mastitis encontramos inflamación del tejido mamario, obstrucciones que dificultan el flujo normal de la leche y grietas en el pezón.

Las mastitis lactacionales se suelen clasificar en subgrupos dependiendo de diferentes criterios. Uno de ellos es la presencia o no de manifestaciones clínicas (mastitis clínicas *versus* subclínicas). Las mastitis clínicas implican signos de inflamación mamaria, que pueden estar acompañados o no por signos sistémicos. El término "*subclínico*" se utiliza para describir aquellos casos caracterizados por una secreción de leche reducida y un alto recuento de bacterias en ausencia de cambios inflamatorios evidentes, incluido el dolor (Contreras, Rodríguez 2011). Dentro de las mastitis clínicas, el tipo de síntomas y evolución de la enfermedad (aguda, subaguda, granulomatosa, crónica y/o recurrente) es un criterio útil para su clasificación, tal y como se describirá posteriormente.

### II.5.3. Etiopatogenia y sintomatología de las mastitis lactacionales

Los principales agentes etiológicos implicados en los distintos tipos de mastitis, así como la sintomatología asociada a cada uno de ellos se muestran en la **Tabla 3**.

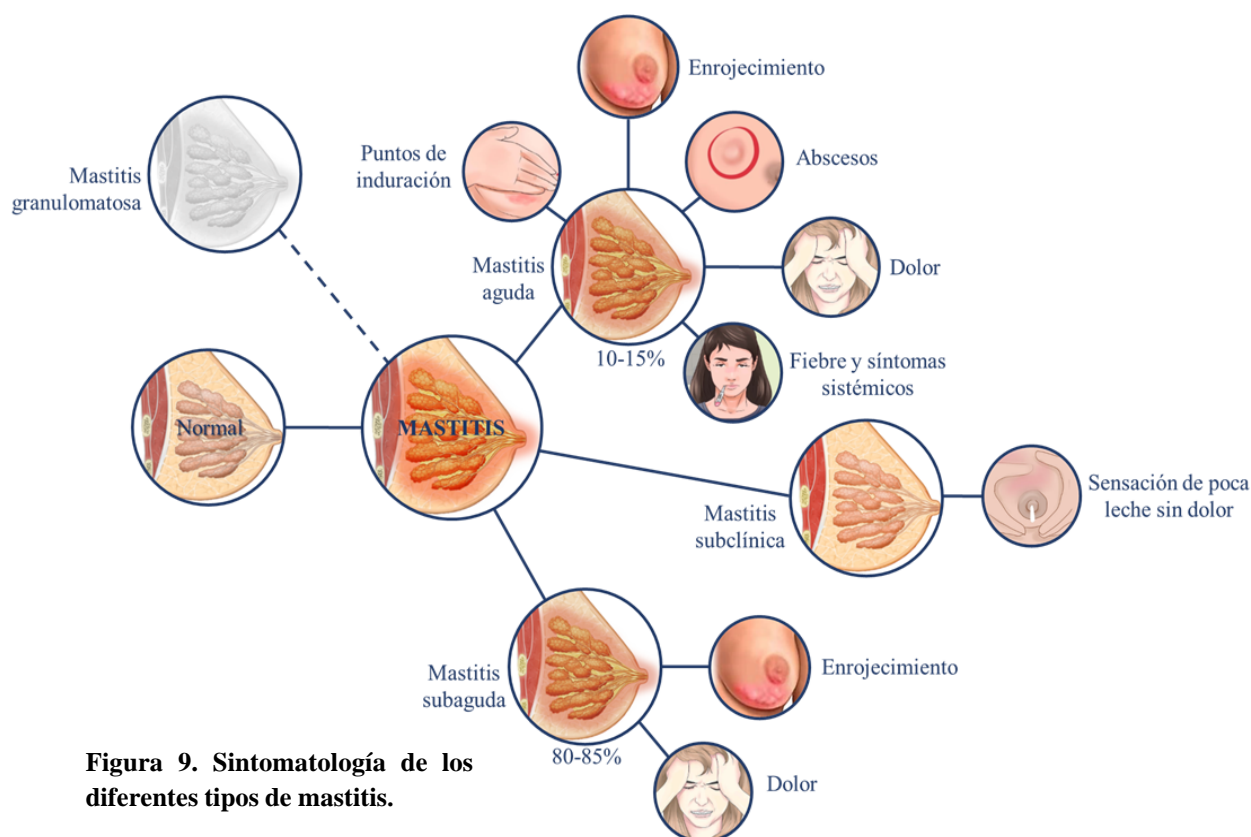
**Tabla 3. Tipos de mastitis, agentes etiológicos y sintomatología más representativa.**

Tipo	Principales agentes etiológicos	Sintomatología <sup>1</sup>
Agudas	<i>S. aureus</i>	<p>Enrojecimiento y dolor</p> <p>Aumento tamaño pecho</p> <p>Zonas de induración</p> <p>Disminución de la secreción de leche</p> <p>Síntomas similares a gripe (fiebre, dolores musculares y articulares, escalofríos...)</p> <p>Abscesos</p>
Subagudas	<p><i>S. epidermidis</i></p> <p><i>St. mitis</i></p> <p><i>St. salivarius</i></p> <p><i>Rothia</i> spp.</p> <p><i>Corynebacterium</i> spp.</p>	<p>Dolor en el pecho (pinchazos, calambres, sensación de quemazón)</p> <p>Zonas de induración</p> <p>Disminución de la secreción de leche</p> <p>Raramente forman abscesos</p>
Granulomatosas	<p><i>Cor. kroppenstedtii</i></p> <p>Otras corynebacterias</p>	<p>Masas inflamatorias dolorosas</p> <p>Consistencia firme</p> <p>A veces con inflamación cutánea</p> <p>Pueden evolucionar hacia úlceras, abscesos, fístulas y/o supuraciones crónicas</p> <p>Deformación del pecho</p>
Subclínicas	<p><i>S. epidermidis</i></p> <p><i>St. mitis</i></p> <p><i>St. salivarius</i></p> <p><i>Rothia</i> spp.</p>	<p>Ausencia dolor</p> <p>Resto similar al de las subagudas</p>

<sup>1</sup>Todos los tipos de mastitis pueden ser recurrentes y pueden cursar con presencia o ausencia de grietas. Las mastitis subagudas pueden convertirse en mastitis crónicas.

### II.5.3.1. Mastitis agudas

Las mastitis agudas se deben, en la mayoría de los casos, a la presencia de *S. aureus* en la glándula mamaria (Delgado et al. 2011, Jiménez et al. 2015, Reddy et al. 2007). Esta especie, a diferencia de otras del mismo género, no suele estar presente en la glándula mamaria en condiciones fisiológicas; sin embargo, muchas personas son portadoras en las mucosas del tracto nasofaríngeo, digestivo o genitourinario, desde donde pueden colonizar la glándula mamaria durante la lactancia. Una vez allí, pueden proliferar y sintetizar toxinas que provocan una gran inflamación del tejido mamario, dando lugar a síntomas locales intensos (enrojecimiento del pecho, calor, dolor...) (**Fig. 9**). Además, pueden provocar una importante ingurgitación del pecho a través de la formación de biopelículas ("*biofilms*") en los conductos galactóforos, tal y como se detallará más adelante al hablar de las mastitis subagudas. Teniendo en cuenta la gran vascularización de la glándula mamaria durante la lactancia, las toxinas se absorben, alcanzan la circulación general y provocan un cuadro sistémico, muy semejante al que se produce durante la gripe, incluyendo fiebre, dolor muscular y articular, y malestar físico general. Las mastitis agudas constituyen una fracción relativamente pequeña de los casos de mastitis humanas pero, debido a que sus signos locales y sistémicos suelen ser muy evidentes, son los únicos que tradicionalmente se han reconocido como tales.



**Figura 9. Sintomatología de los diferentes tipos de mastitis.**

Algunas mastitis agudas (0,5-3%) pueden desembocar en la formación de abscesos y, en tales casos, es frecuente que las cepas de *S. aureus* implicadas



sean resistentes a la meticilina (SARM) y otros antibióticos (Holmes, Zadoks 2011, Irusen et al. 2015).

### II.5.3.2. Mastitis subagudas y subclínicas

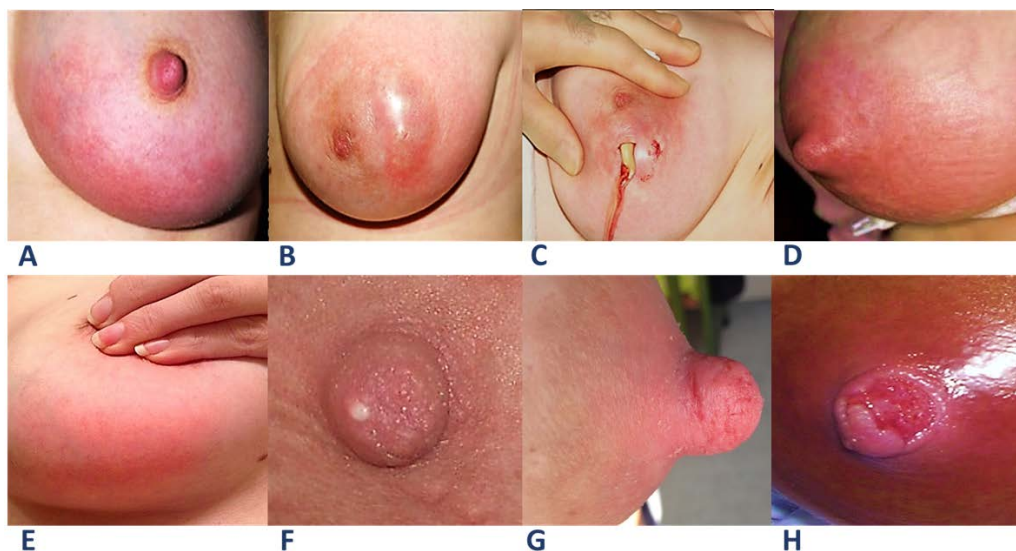
Las mastitis subagudas son las más frecuentes y, a la postre, las que causan un mayor número de casos de interrupción precoz de la lactancia por lo que merecen una atención especial. En este caso, el problema se debe a un sobrecrecimiento de ciertas especies de estafilococos coagulasa-negativos (SCN), estreptococos de los grupos *mitis* o *salivarius* y algunas especies del género *Corynebacterium* en el interior de los conductos galactóforos. Todas ellas, a diferencia de *S. aureus*, son habituales en la glándula mamaria durante la lactancia pero a concentraciones muy moderadas ( $< 10^3$  ufc/mL). En condiciones fisiológicas, se disponen formando una película fina en los bordes internos de los conductos, permitiendo un flujo completamente normal de leche (**Fig. 8**). La presión de la leche al salir hace que algunas de estas bacterias se pongan en suspensión en este fluido. No obstante, existen ciertos factores (que se contemplarán posteriormente) que hacen que estas bacterias puedan proliferar y alcanzar concentraciones por encima de las fisiológicas ( $> 10^3$  ufc/mL) provocando un cuadro de mastitis subaguda.

Las especies implicadas en estos casos no sintetizan toxinas por lo que no pueden provocar ni un cuadro local agudo ni síntomas sistémicos. En este caso, el dolor se debe a que las bacterias, al sobrecrecer, forman densas biopelículas en el interior de los conductos galactóforos. Este hecho conduce, por una parte, a la inflamación del epitelio mamario (al estar soportando una densidad bacteriana mucho mayor de lo normal) y, por otra, a que la leche tenga que pasar por un conducto cuya luz es cada vez más estrecha; al pasar por un lugar cada vez más estrecho, la leche (como cualquier otro fluido) ejerce una presión cada vez mayor. Esa mayor presión se ejerce sobre un epitelio que está inflamado, de tal manera que cuando la leche pasa por ese conducto origina dolor (referido en muchas ocasiones como dolor en forma de “cristales”, “agujas”...), con calambres ocasionales (que pueden llegar a ser intensos y reflejar hacia la espalda o la axila) y, a veces, sensación de quemazón.

Si el crecimiento es particularmente elevado, las bacterias pueden llegar a obstruir totalmente los conductos galactóforos; en consecuencia, se produce una ingurgitación (también conocida como estasis o retención de leche) que empeora los síntomas locales (dolor, zonas de induración en el interior del pecho). Es frecuente que este hecho proporcione a la madre la falsa sensación de que la producción de leche ha disminuido; sin embargo, en estos casos, no está afectada la producción sino la secreción: una parte importante de la leche que se produce no se secreta sino que se retiene y se reabsorbe, lo que afecta sensiblemente al caudal que se eyecta al exterior. Muchas veces, la disminución de caudal es perceptible a simple vista ya que la leche en vez de salir

simultáneamente por varios orificios del pezón y a propulsión, acaba saliendo por uno o dos orificios y escurriendo o en forma de goteo. El hecho de que no se suelen acompañar de enrojecimiento local ni de síntomas sistémicos confunde frecuentemente el diagnóstico clínico y provoca que se trate de un problema infradiagnosticado.

La disminución del caudal de leche tiene dos efectos sobre el niño: (a) que las tomas sean más largas y/o más frecuentes; y (b) que el niño tenga dos tipos de comportamiento durante las mismas; en algunas ocasiones el niño está tranquilo, relajado..., pero en otras está enfadado y hace un amamantamiento más agresivo, tirando bruscamente del pezón y haciendo unos movimientos muy característicos con la cabeza. El hecho de que el niño tenga que estar más tiempo en un pecho inflamado unido a que, en ciertas fases, tenga un amamantamiento más agresivo hacen que la glándula mamaria se siga inflamando y determina un círculo vicioso característico de las mastitis subagudas. En ocasiones, cuando estas obstrucciones ocurren en los propios orificios del pezón, se forman unas estructuras características, integradas por una matriz de calcio recubierta de bacterias, conocidas como “ampollas” o “perlas” de leche (**Fig. 10**).



**Figura 10. Imágenes de casos reales de mastitis infecciosa.** A, pecho enrojecido. B, absceso. C, absceso con drenaje. D, pecho y pezón inflamados. E, pecho enrojecido. F, “perla de leche” en el pezón. G, grieta en el pezón. H, erosión en el pezón.

Desafortunadamente, en los pocos casos en que se realizan cultivos de leche humana, SNC y los estreptococos de los grupos *mitis* y *salivarius* se suelen considerar generalmente como bacterias “comensales” o “saprofitas”, independientemente de su concentración. Por lo tanto, si hay una concentración alta ( $> 10^3$  ufc/mL) de estas bacterias en la leche pero, por ejemplo, no se detecta *S. aureus*, entonces el caso se suele declarar - erróneamente - como mastitis “no infecciosa”. Esto hace que las mastitis



subagudas se infradiagnostiquen de forma casi sistemática, a pesar de ser la causa más frecuente de mastitis clínicas, de lactancia materna dolorosa y de destete precoz e indeseado (Jiménez et al. 2009, Delgado et al. 2009a).

A pesar de ello, los SCNs se han convertido en la causa más frecuente de mastitis tanto en humanos como en rumiantes y otros mamíferos (Zhang, Maddox 2000, Thorberg et al. 2009). Entre los SCN, *S. epidermidis* es la especie más comúnmente asociada con las mastitis lactacionales (Thomsen et al. 1985, Delgado et al. 2008, Jiménez et al. 2008b, Delgado et al. 2009c, Arroyo et al. 2010). Normalmente, se trata de un habitante comensal de la piel humana y de las superficies mucosas pero también es un patógeno oportunista y nosocomial muy común (Otto 2009, Schoenfelder et al. 2010). Aunque los SCNs que causan mastitis no suelen ser tan virulentos como las cepas de *S. aureus*, se trata de agentes muy relevantes ya que pueden causar infecciones persistentes (crónicas, recurrentes), que causan daño tisular y una disminución de la cantidad de leche secretada y de la calidad de la misma.

Algunas especies de la Familia *Micrococcaceae* (que está estrechamente relacionada, desde un punto de vista taxonómico, con la Familia *Staphylococcaceae*), incluyendo *Rothia dentocariosa*, *Rothia mucilaginosa*, *Kocuria rosea* y *Kocuria kristinae* (especies que a menudo están involucradas en infecciones oportunistas humanas) también pueden causar mastitis. En los últimos años, los reordenamientos taxonómicos que han afectado a miembros de estas familias pueden ser responsables de la identificación errónea de aislados pertenecientes a estas especies. En cualquier caso, se requieren más estudios para aclarar su relevancia como agentes de mastitis humanas.

Las especies de estreptococos asociadas con mastitis parecen ser específicas dependiendo de la especie a la que pertenezca el huésped. *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis* o *Streptococcus dysgalactiae* son agentes frecuentes de mastitis en el ganado bovino (Keefe 1997), pero muy raramente se han implicado en casos de mastitis humanas (Di Domenico et al. 2015). En contraste, las especies de estreptococos más comunes que afectan a los seres humanos son *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* y especies relacionadas (Martín et al. 2016a, Mediano et al. 2017, Delgado et al. 2009c, Marín et al. 2017). Es importante señalar que los estreptococos han sido sometidos a importantes reordenamientos taxonómicos y que en los últimos años se han descrito nuevas especies del género *Streptococcus* y de otros géneros estrechamente relacionados; por lo tanto, la implicación de los estreptococos en la mastitis debe ser cuidadosamente reevaluada (Martín et al. 2016b).

#### *II.5.3.3. Mastitis granulomatosas*

Algunas corinebacterias, incluyendo *Corynebacterium kroppenstedtii*, *Corynebacterium amycolatum* y *Corynebacterium tuberculostearicum*, están

implicadas en mastitis granulomatosas (Yu et al. 2016), una enfermedad inflamatoria crónica que se consideraba previamente como de etiología desconocida o "*idiopática*" (Renshaw et al. 2011). Las pacientes suelen presentar zonas abultadas, ligeramente blandas, que a veces se asocian con inflamación local y un aumento de la sensibilidad. Estas mastitis pueden llegar a ser crónicas y, en tales casos, suelen desfigurar el pecho y tender a la formación de abscesos y fístulas (**Fig. 11**). Dado que las corinebacterias se tiñen mal mediante la técnica de Gram, que a menudo no crecen en los medios habituales de cultivo y que se encuentran formando estructuras granulomatosas en el interior del tejido mamario, es probable que su relevancia como agentes causantes de mastitis haya pasado desapercibida durante décadas (Paviour et al. 2002, Bercot et al. 2009).

**Figura 11. Imágenes de casos de mastitis granulomatosas.**

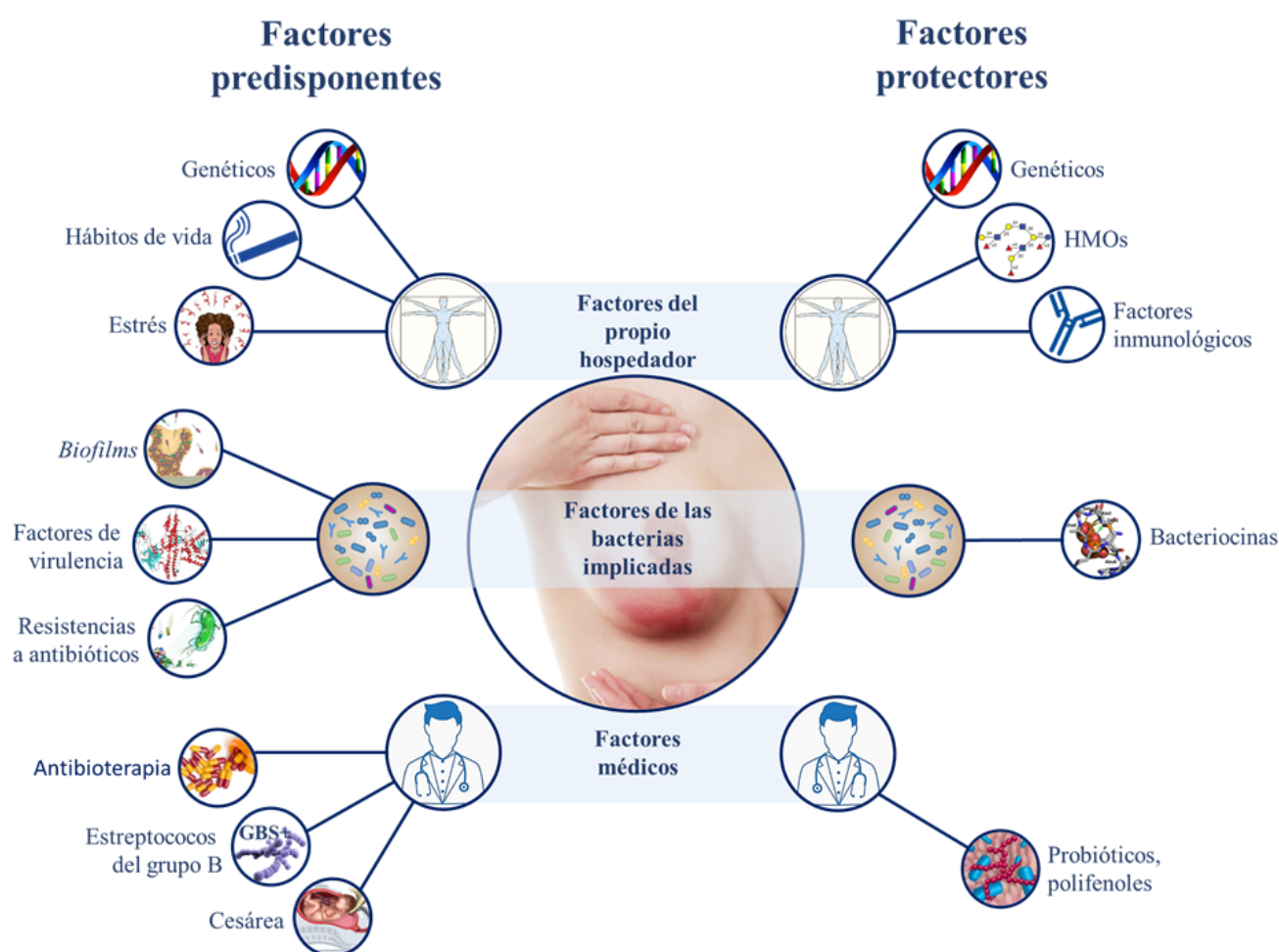


En los casos de mastitis granulomatosa, las corinebacterias se encuentran en preparaciones histológicas de tejido mamario profundo, rodeadas por una reacción inflamatoria granulomatosa. Histológicamente, las lesiones se caracterizan por una lobulitis crónica, necrotizante, no caseificante, con formación de granulomas. Los granulomas tienen una apariencia muy característica: una capa externa de histiocitos epitelioides que rodea a una colección de polimorfonucleares neutrófilos. A su vez, los polimorfonucleares neutrófilos se disponen alrededor de una vacuola central que contiene lípidos disueltos (motivo por el que también reciben el nombre de lipogranulomas supurativos) y en la que se encuentran las corinebacterias (Renshaw et al. 2011, Troxell et al. 2016). Las corinebacterias implicadas suelen tener un marcado carácter lipofílico, propiedad que parece particularmente relevante en la patogenia de este tipo de mastitis. De hecho, su lipofilia le permite crecer firmemente adherido a los glóbulos de grasa, lo que le proporciona acceso a una

abundante fuente exógena de ácidos grasos. El hecho de que estas bacterias afecten especialmente a mujeres en edad fértil, entre algunos meses y pocos años después de haber tenido un hijo, sugiere que su sobrecrecimiento puede estar estrechamente ligado a la gran disponibilidad de ácidos grasos durante la lactancia. Como los granulomas se desarrollan lentamente, es frecuente que el cuadro clínico aparezca incluso algunos meses después de haber finalizado la lactancia.

#### II.5.4. Factores que protegen o que predisponen a las mastitis

Al igual que en otros lugares del cuerpo, la salud mamaria parece depender, al menos parcialmente, del equilibrio entre el estado del huésped y su microbiota, que puede contener microorganismos que van desde simbioses o probióticos hasta agentes potencialmente infecciosos. Por lo tanto, hay muchos factores propios del hospedador, microbianos y/o médicos que pueden desempeñar papeles importantes en la protección o predisposición frente a las mastitis (**Fig. 12**).



**Figura 12.** Factores predisponentes y protectores en la aparición de mastitis.

#### II.5.4.1. Factores relacionados con el hospedador

La existencia de una base genética para las respuestas del huésped a infecciones intramamarias bacterianas ha sido ampliamente documentada en rumiantes (Swiderek et al. 2006, Wang et al. 2007, Alain et al. 2009, Xu et al. 2010, Sorensen et al. 2008, Gupta et al. 2015, Song et al. 2016, Dinesh et al. 2015). En humanos, hace unos años se describió el primer caso de mastitis granulomatosa por *C. kroppenstedtii* asociada a un polimorfismo de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) dentro del gen NOD2 (SNP13 [Leu1007fsinsC]) (Bercot et al. 2009). En el mismo trabajo se observó que dicho SNP provocaba una notable alteración de las respuestas de los neutrófilos mamarios. El mismo SNP (y otros SNPs) en ese mismo gen parece relacionado con otras patologías, como el cáncer de colon (Tian et al. 2010) o la enfermedad de Crohn (Salem et al. 2015). Por otra parte, se ha observado una mayor susceptibilidad frente a infecciones de *S. aureus* en diversas enfermedades genéticas, como el síndrome de Chédiak-Higashi, el síndrome de hiper-IgE, la deficiencia de IRAK-4 o la deficiencia de MyD88 (Messina et al. 2016).

Además, se ha sugerido que algunas cepas de estafilococos y estreptococos pueden utilizar mecanismos de mimetismo molecular para evadir la respuesta del SI (Thibodeau et al. 1994, Giordano et al. 1996, Nooh et al. 2007). Las rutas de señalización a través de los receptores de tipo Toll 2 (TLR2) juegan un papel clave en las infecciones estafilocócicas debido a las interacciones entre este receptor y los componentes mayoritarios de la pared celular estafilocócica (Takeuchi et al. 1999, Takeuchi et al. 2000, von Bernuth et al. 2008, Kawai, Akira 2010, Wang et al. 2012).

Las diferencias en los determinantes genéticos de la biosíntesis de ~~la~~ selectina, los antígenos de Lewis y HMOs del huésped también pueden predisponer o proteger contra la mastitis mediante la alteración de la activación de los neutrófilos y de la producción de especies reactivas de oxígeno. Los HMOs presentes en la leche humana son capaces de modular la microbiota de los lactantes amamantados (Bode 2012). Por lo tanto, se puede especular que los HMOs también son capaces de modular las comunidades bacterianas en la glándula mamaria. Se han identificado cuatro grupos de leche humana sobre la base de antígenos de Lewis y de su componente secretor/no secretor (Albrecht et al. 2011, Thurl et al. 2010). Mientras que la leche de las mujeres "secretoras" es rica en 2'-fucosil-lactosa y otros HMOs  $\alpha$ 1-2-fucosilados, las mujeres "no secretoras" carecen de una enzima FTU2 funcional y, en consecuencia, carecen de HMOs  $\alpha$ 1-2-fucosilados. Curiosamente, algunas cepas de *Staphylococcus*, el principal género causante de mastitis, son capaces de unirse a la 2'-fucosilactosa (Lane et al. 2011). Por lo tanto, es posible que la susceptibilidad a padecer mastitis esté determinada no sólo por la composición bacteriana de la leche humana, sino también por el grupo sanguíneo y el tipo de HMO presente en la leche.

La leche humana contiene muchas otras sustancias biológicamente activas y una expresión más alta o más baja de los genes responsables de su biosíntesis puede estar relacionada con un mayor o menor riesgo de mastitis. En este contexto, los polimorfismos o variaciones en el número de copias de genes que codifican péptidos antimicrobianos eucariotas pueden estar relacionados con la susceptibilidad a la mastitis (Rivas-Santiago et al. 2009). A modo de ejemplo, la catelicidina LL-37, expresada en la glándula mamaria y secretada en la leche, muestra una actividad antimicrobiana relevante contra agentes potenciales de mastitis (Murakami et al. 2005) y, además, tiene un fuerte efecto anti-*biofilm* incluso a concentraciones subinhibitorias (Jacobsen, Jenssen 2012). La alfa-lactalbúmina humana letal para células tumorales (HAMLET) es otro ejemplo. Se trata de un complejo proteína-lípido de la leche humana con actividad bactericida frente a diversos patógenos, como *Streptococcus pneumoniae*. Además, HAMLET actúa como un adyuvante antimicrobiano que puede aumentar la actividad de un amplio espectro de antibióticos (metecilina, vancomicina, gentamicina y eritromicina) frente a cepas de *S. aureus* multirresistentes a antibióticos (Marks et al. 2013).

#### II.5.4.2. Factores microbianos

La composición del microbioma de la leche es dependiente del huésped (Martín et al. 2007b, Hunt et al. 2011, Cabrera-Rubio et al. 2012, Jost et al. 2013, Jiménez et al. 2015). Por lo tanto, esta composición puede ser un factor importante para determinar si una mujer sufrirá o estará protegida frente a las mastitis.

Recientemente, Sam Ma et al. (2015) construyeron una red de las interacciones bacterianas que consistía en ocho géneros (o nodos); todas las interacciones entre estos nodos eran cooperativas salvo con los nodos *Staphylococcus* y *Corynebacterium* que, en contraste, eran mutuamente cooperativos entre sí. Precisamente estos dos géneros incluyen algunos de los principales patógenos oportunistas mamarios. Los autores sugirieron que esta alianza potencialmente "*maligna*" entre *Staphylococcus* y *Corynebacterium* podría ser inhibida por los nodos restantes que, a su vez, cooperan entre ellos (la alianza "*benigna*") pero, cuando no es el caso, la disbiosis resultante puede desembocar en una mastitis.

La capacidad de colonizar y, eventualmente, infectar a un huésped depende no sólo de cada especie bacteriana, sino de cada cepa dentro de una misma especie, e incluye la expresión de factores de virulencia, la resistencia a los antimicrobianos, la capacidad para formar *biofilms* y la presencia de otros mecanismos para eludir la respuesta inmunitaria del huésped (Park et al. 2011,

Rigby, DeLeo 2012, Stach et al. 2015, Bukowski et al. 2010, McCarthy, Lindsay 2010, Stapels et al. 2016).

A nivel de especie, se han observado algunas alteraciones transcripcionales mamarias que son específicas del patógeno y que pueden determinar el curso y la gravedad de la enfermedad (Bannerman et al. 2004, Rinaldi et al. 2010). El análisis de los genomas ya disponibles revela que, globalmente, *S. aureus* está mucho más capacitado para desarrollar infecciones agudas que los SCNs, que a su vez tienen una mayor propensión a causar infecciones subagudas, subclínicas o crónicas (Gill et al. 2005). Por ejemplo, los miembros de las familias de enterotoxinas y exotoxinas que funcionan como superantígenos e inductores de una respuesta de citoquinas pro-inflamatorias están normalmente asociados con *S. aureus* (Hu et al. 2008, Larsen et al. 2002, Smyth et al. 2005). En esta especie se han identificado siete islotes de patogenicidad (*¡Sas*), que contienen los genes responsables de la biosíntesis de aproximadamente la mitad de las toxinas y factores de virulencia de esta especie. Las variaciones en el potencial patogénico y en la resistencia a los antibióticos de las cepas pertenecientes a esta especie dependen en gran medida de la variación alélica de los genes de virulencia, de la presencia o ausencia de *¡Sas* y de la presencia de SNPs en genes clave (Gill et al. 2005). Otros estudios, también han encontrado diferencias en genes y/o toxinas relacionadas con la virulencia y la resistencia a antibióticos entre cepas de *S. aureus* implicadas en casos de mastitis bovinas y humanas (Barkema et al. 2006, Monecke et al. 2007, Delgado et al. 2011, Wolf et al. 2011).

Como se ha indicado anteriormente, el efecto beneficioso o perjudicial de un microorganismo mamario puede depender no sólo de sus relaciones con otros miembros de la microbiota, sino también de las establecidas con el huésped. Algunas cepas de *S. epidermidis* constituyen un buen ejemplo de una relación beneficiosa entre las bacterias y el ecosistema mamario a través de la modulación de la inflamación dependiente de TLR3 (Lai et al. 2009). En la piel, esta bacteria también induce a los queratinocitos a expresar péptidos antimicrobianos endógenos a través de un mecanismo dependiente de TLR2 (Lai et al. 2010), una propiedad que hasta ahora no se ha explorado en los aislados obtenidos a partir de la leche humana. Además, se ha descrito que *S. epidermidis* es capaz de ejercer un control autónomo sobre las funciones de los linfocitos T en ratones libres de patógenos específicos (*germ free*) (Naik et al. 2012).

Los microorganismos comensales pueden convertirse en patógenos bajo ciertas condiciones y precisamente *S. epidermidis* constituye uno de los ejemplos más prominentes en este sentido. Recientemente se ha descrito la presencia de una isla de patogenicidad en *S. epidermidis* que codifica dos enterotoxinas (Madhusoodanan et al. 2011), lo que sugiere la posibilidad de su transmisión a partir de cepas patógenas de *S. aureus* (Yu et al. 2017). *S. epidermidis* es el



principal agente causal de infecciones de dispositivos médicos (catéteres, sondas...) ya que se puede transferir desde la piel del paciente o del personal sanitario durante la inserción del dispositivo. Una vez que las bacterias han entrado en el cuerpo utilizan varios factores de virulencia para facilitar las interacciones con los tejidos del huésped y subvertir su sistema inmunológico. El factor más relevante de virulencia en esta especie concreta es la formación de *biofilms* en el interior de tales dispositivos. Curiosamente, las glándulas mamarias lactantes contienen una red muy compleja de conductos durante la lactancia que proporciona un excelente soporte físico a este microorganismo. Además, su metabolismo de la lactosa y la galactosa es muy eficiente a través de la vía del D-tagatosa-6-fosfato (Schleifer et al. 1978). Finalmente, esta especie tiene una excelente capacidad para metabolizar los oligosacáridos de la leche humana (Hunt et al. 2012).

Los *biofilms* son aglomeraciones de microorganismos multicelulares, adheridas a una superficie. Su regulación implica sistemas de percepción de quorum que todavía no se conocen bien. Diversos estudios epidemiológicos y moleculares han mostrado que los aislados de *S. epidermidis* pueden diferir en su capacidad de formación de *biofilms*, resistencia a antibióticos y presencia de elementos genéticos móviles. La mayoría de las cepas de *S. epidermidis* productoras de *biofilms* y asociadas a infecciones dependen de la expresión de la adhesina de polisacárido intercelular (PIA), codificado en el operón *ica*. En este contexto, la comparación de varias propiedades de 200 cepas de *S. epidermidis* aisladas de leche de mujeres con mastitis con las mostradas por 105 aisladas de mujeres sanas, reveló que el número de cepas que contenían genes relacionados con la formación de *biofilm* y que mostraban resistencia a oxacilina, eritromicina, clindamicina y mupirocina fue significativamente mayor entre las cepas aisladas de la leche de mujeres con mastitis (Delgado et al. 2009b). La resistencia a diversos antibióticos y una mayor capacidad para formar *biofilms* encontrados entre las cepas clínicas pueden explicar la naturaleza crónica y recurrente de las mastitis (Otto 2012, Solati et al. 2015, Kleinschmidt et al. 2015, Liu et al. 2015).

#### II.5.4.3. Factores médicos

Existen dos prácticas comunes durante el último tercio del embarazo, el parto y la lactancia que pueden tener un profundo impacto en el microbioma mamario y de la leche: la antibioterapia y el suplemento de hierro. En un balance beneficio-riesgo, ambas prácticas pueden ser necesarias para prevenir o tratar diferentes patologías; sin embargo, se debe evitar su uso cuando no hay una indicación médica clara.

La antibioterapia periparto, frecuentemente relacionada con las cesáreas, las rupturas prematuras o prolongadas de membranas o la colonización recto-vaginal con estreptococos del grupo B (GBS), ha surgido como un fuerte factor

de riesgo para las mastitis humanas debido a la selección de bacterias resistentes a los antibióticos en el medio mamario y la eliminación de potenciales competidores naturales (Delgado et al. 2009a, Jiménez et al. 2009). La resistencia a los antibióticos debido a mecanismos dependientes o independientes de la formación de *biofilms*, parece ser un rasgo relativamente extendido entre los organismos causantes de la mastitis (Begovic et al. 2013, Delgado et al. 2009b).

En un estudio reciente, se evaluó la influencia de varios factores en la presencia o ausencia de lactobacilos y bifidobacterias en la leche humana (Soto et al. 2014). El factor que más influyó en su ausencia fue la administración de antibioterapia a las madres durante el embarazo o la lactancia. Los lactobacilos también se detectaron menos frecuentemente en la leche de las mujeres que habían sido sometidas a cesárea, probablemente debido a la antibioterapia asociada a dicha cirugía.

Actualmente está ampliamente aceptado que los antibióticos son responsables de procesos de disbiosis en la microbiota humana, dando lugar a diarreas, infecciones genitourinarias y orales. Las interacciones huésped-microbiota son dinámicas y, por lo tanto, los cambios en la microbiota como consecuencia del tratamiento con antibióticos pueden resultar en la desregulación de la función de barrera y de la homeostasis inmunitaria del huésped y en una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas, alérgicas e inflamatorias (Joffe, Simpson 2009, Willing et al. 2011). La antibioterapia durante el embarazo, el intraparto o la lactancia altera la microbiota materna (intestinal, vaginal, mamaria), un hecho que puede tener consecuencias negativas para la salud infantil (Murk et al. 2011, Stensballe et al. 2013). La disminución de las poblaciones de lactobacilos y bifidobacterias en la leche humana puede tener consecuencias negativas para los lactantes amamantados, ya que son miembros importantes de la microbiota intestinal humana en la infancia y juegan un papel beneficioso en el mantenimiento de la salud. Algunos estudios han sugerido que los bebés que carecen o poseen bajas concentraciones fecales de estas bacterias son más susceptibles a una amplia variedad de trastornos gastrointestinales y alergias (Arvola et al. 2006). Recientemente, un análisis exhaustivo del microbioma fecal de niños que padecían cólico del lactante reveló una disminución significativa de su contenido en bifidobacterias y lactobacilos en comparación con los niños controles (de Weerth et al. 2013b). En este sentido, varios ensayos han demostrado la eficacia de una cepa de *Lactobacillus reuteri* aislada de leche humana en el tratamiento del cólico del lactante (Savino et al. 2010, Szajewska et al. 2013). La pérdida de lactobacilos y bifidobacterias en la leche asociada a la antibioterapia también puede tener consecuencias negativas para la salud mamaria debido al sobrecrecimiento de los agentes causantes de mastitis (Contreras, Rodríguez 2011).



La prescripción de hierro se ha convertido en una práctica habitual durante el embarazo y la lactancia, incluso para mujeres cuyos parámetros hematológicos relacionados con el hierro están dentro de los valores fisiológicos y, por lo tanto, no necesitan suplementos adicionales. El potencial REDOX del hierro le convierte en un cofactor ideal en diversas reacciones bioquímicas y es vital para el crecimiento y proliferación de bacterias patógenas. Los vertebrados poseen mecanismos para secuestrar el exceso de hierro con el fin de aliviar su toxicidad y restringir la cantidad de hierro libre disponible para los patógenos (Hammer, Skaar 2011). La restricción del crecimiento de microorganismos potencialmente infecciosos mediante el secuestro de nutrientes esenciales se denomina inmunidad nutricional. Con el fin de eludir la inmunidad nutricional, algunos patógenos bacterianos han desarrollado sistemas elegantes que permiten la adquisición de hierro durante la infección. En el caso de *S. aureus*, la adquisición de hierro a través de la producción de sideróforos y el consumo de grupos hemo del huésped es un requisito necesario para su colonización, proliferación y posterior patogénesis (Beasley, Heinrichs 2010, Haley, Skaar 2012).

De forma similar, la capacidad de *S. epidermidis* para resistir la alta actividad bactericida de la sangre humana es crucial para su diseminación sistémica, incluyendo la colonización de la glándula mamaria durante la segunda mitad embarazo y la lactancia, períodos en los que está altamente vascularizada. El estudio del transcriptoma obtenido a partir de *biofilms* de *S. epidermidis* en contacto con sangre humana mostró una mayor transcripción de los genes implicados en la biosíntesis y metabolismo de aminoácidos, ácidos carboxílicos y cetonas (Franca et al. 2014). Sin embargo, uno de los cambios más llamativos observados después de 4 h de exposición de *S. epidermidis* a la sangre humana fue una mayor expresión de los genes implicados en la utilización de hierro. Este hallazgo sugiere que la adquisición de hierro es un evento importante para la supervivencia de *S. epidermidis* en la sangre humana (Franca et al. 2014). Por lo tanto, la ingesta de hierro durante el embarazo as últimas fases del embarazo y durante el período de lactancia puede favorecer el crecimiento selectivo de los estafilococos mamarios, aumentando el riesgo de mastitis y, en consecuencia, debe ser prescrito sólo cuando es realmente necesario.

## II.5.5. Diagnóstico microbiológico

### II.5.5.1. Los cultivos de leche: una herramienta imprescindible

Las mastitis humanas, como ya se ha señalado anteriormente, constituyen un problema tan infravalorado como infradiagnosticado. Este hecho se debe, por una parte, a que únicamente se suelen considerar como tales los casos agudos que cursan con enrojecimiento del pecho y fiebre elevada. Por otra, a que los casos en los que se realiza un cultivo de leche son verdaderamente excepcionales y, cuando se hacen, la recogida de la muestra y/o la interpretación de los

resultados suele ser errónea debido a la ausencia de protocolos estandarizados. En tales circunstancias, el diagnóstico de “mastitis” se suele basar en la inspección visual del pecho, lo que no sólo excluye a la mayoría de los casos sino que fomenta falsas creencias, como la de que el amamantamiento doloroso se debe a una infección fúngica. En consecuencia, la posibilidad de error en el diagnóstico de mastitis es muy elevada. Por lo tanto, estaría indicado realizar un diagnóstico microbiológico en todas aquellas mujeres con un amamantamiento doloroso, independientemente de que sea unilateral o bilateral. En este sentido, el análisis microbiológico de la leche es el único medio posible de obtener un diagnóstico etiológico de mastitis. El cultivo de leche no sólo es esencial para el diagnóstico etiológico de una mastitis, sino que puede ser clave para el éxito del abordaje terapéutico, mediante la realización de los correspondientes antibiogramas.

La Organización Mundial para la Salud (OMS) sugiere que se realicen cultivos de leche y antibiogramas en los siguientes casos: (a) cuando no exista repuesta a los antibióticos tras los 2 primeros días de tratamiento; (b) cuando se trate de un caso recurrente; (c) cuando la paciente sea alérgica a los antibióticos más habituales; y (d) en casos severos o inusuales (World Health Organization (WHO), Department of Child and Adolescent Health and Development 2000). Algunas de estas circunstancias son comunes en los casos de mastitis lo que, unido a la preocupación actual por la rápida propagación de las resistencias a antibióticos, hace que la realización de un cultivo esté indicada en cualquier caso de sospecha de mastitis.

Hace poco más de cinco años, se publicó en *Acta Pediátrica Española* el artículo titulado "*Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana*" (Arroyo et al. 2011). Su contenido se complementaba con otro publicado unos meses más tarde en la misma revista y en el que se proponían unas pautas para el tratamiento empírico de las mastitis sobre la base de la sintomatología y los agentes etiológicos implicados (Carrera et al. 2012). Con el tiempo, aquella primera propuesta inicial, con pequeñas modificaciones, ha pasado a formar parte del protocolo número 54 ("*Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio*", sección 4 "*Mastitis: diagnóstico microbiológico*") de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) (Delgado et al. 2015).

Nunca antes se había hecho un intento de estandarizar la forma de recoger, conservar y procesar la muestra de leche ante una sospecha de mastitis. Se trata de un hito en el ámbito de la lactancia materna ya que es el primer protocolo específico y puede servir de referencia para otros muchos países de nuestro ámbito. En este contexto, un extracto del artículo "*Is the Medical Community Failing Breastfeeding Moms?*", publicado por la revista *Time* en enero

de 2013 (Davis 2013) puede ayudar a comprender el impacto que puede derivarse de la disponibilidad de ese tipo de pruebas:

*"The problem isn't free formula samples at hospitals, but a lack of trained professional help for women with serious breastfeeding problems. Lactation is probably the only bodily function for which modern medicine has almost no training, protocol or knowledge. When women have trouble breast-feeding, they're either prodded to try harder by well-meaning lactation consultants or told to give up by doctors. They're almost never told, "Perhaps there's an underlying medical problem—let's do some tests.*

*When women have trouble breast-feeding, they are often confronted with two divergent directives: well-meaning lactation consultants urge them to try harder, while some doctors might advise them to simply give up and go the bottle-and-formula route. "We just give women a pat on the head and tell them their kids will be fine," if they don't breastfeed, says Dr. Alison Stuebe, an obstetrician who treats breast-feeding problems in North Carolina. No one argues that breast is best, but the truth is that breast-feeding is very difficult for many women, and for some, medical problems make it almost impossible without intervention.*

*What do doctors learn about breast-feeding in medical school? "We learned that it's what's best for baby," said my own pediatrician. "But that's it." "It's an hour, or a half a day, and [students] don't remember anything," says Dr.*

*Todd Wolynn, a Pittsburgh pediatrician and executive director of the Breastfeeding Center of Pittsburgh. There were years, he says, when there was literally nothing said about breast-feeding at all. In addition, doctors practicing today don't know where to place breast-feeding problems—breasts are attached to the women, so shouldn't they be the province of obstetricians, say pediatricians. And obstetricians note that breast-feeding is for infants; shouldn't the baby's doctor handle it?"*

Los cultivos de leche humana tienen gran utilidad a varios niveles: (a) investigación; (b) vigilancia epidemiológica; y (c) práctica médica. Por lo que se refiere a la investigación, la leche humana es una fuente relevante de microorganismos para el intestino del lactante y cada vez son más los grupos de investigación dedicados total o parcialmente a estudiar la microbiota o el microbioma de la leche humana, su papel en la colonización infantil y sus funciones biológicas (Fernández et al. 2013a, Jost et al. 2013, Bäckhed et al. 2015). Dado que las mastitis son la consecuencia de una disbiosis mamaria, también existe un interés creciente en valorar cómo influye ese estado en el desarrollo de la microbiota infantil e, incluso, si tiene alguna relación con otras patologías mamarias.

Desde el punto de vista de la vigilancia epidemiológica, sería de gran interés incorporar muestras de leche a los cultivos que se hacen con esa finalidad ya que con relativa frecuencia contiene bacterias relevantes en ese sentido, como estafilococos (incluyendo SARM y SERM) o enterococos (Bou et al. 2015, David, Daum 2017). Conviene tener en cuenta que la leche puede ser un buen indicativo de la presencia de bacterias resistentes en la comunidad y, en ocasiones, constituir una fuente de este tipo de bacterias para la colonización inicial del intestino infantil, especialmente en casos de mastitis no diagnosticadas y/o no tratadas correctamente.

Por lo que respecta a la utilidad en la praxis médica diaria, los cultivos permitirían hacer un diagnóstico precoz e instaurar el tratamiento más adecuado en cada caso. Es muy frecuente que las mujeres con mastitis tarden varias semanas en conocer que tienen ese problema y, mientras tanto, se sometan a toda una serie de consejos, en ocasiones sin evidencias o directamente desafortunados, que conducen a la cronificación del caso o a la asunción todavía frecuente de que la lactancia duele incluso en condiciones fisiológicas. Habitualmente, el tratamiento de las mastitis se instaura de forma empírica. La información proporcionada por las pacientes o por los estudios metabólicos de su orina (Vázquez-Fresno et al. 2014) revela que, en dichas circunstancias, un porcentaje elevado recibe o recurre (siempre de forma empírica) a combinaciones, de forma simultánea o sucesiva, de antiinflamatorios/analgésicos (ibuprofeno, paracetamol, metamizol, dexketoprofeno...), antimicrobianos (cloxacilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, ciprofloxacino, levofloxacino, eritromicina, cefalosporinas, fosfomicina, mupirocina, ácido fusídico, cotrimoxazol, cotrimazol, fluconazol...) y, en ocasiones, hasta antidepresivos, bien porque se los haya recetado un médico o bien por automedicación. Desafortunadamente, un porcentaje cada vez más elevado de cepas implicadas en mastitis son resistentes a estos antibióticos, una situación que se ha descrito previamente para las cepas asociadas con mastitis bovina.

En este contexto, la realización de cultivos y antibiogramas no sólo no conduce a un mayor número de tratamientos médicos como algunos puedan pensar sino, bien al contrario, a una disminución drástica de la medicalización durante la lactancia, con una reducción del coste para el sistema de salud.

Ante la ausencia de un diagnóstico etiológico y la frecuente prescripción de un tratamiento inadecuado, las mujeres con este problema suelen enfrentarse a un difícil dilema: (1) seguir amamantando a su hijo aguantando el dolor y el resto de síntomas lo mejor posible o (2) abandonar la lactancia. Sin embargo, un número creciente de mujeres lactantes que se encuentran ante este problema exigen una tercera vía: un correcto diagnóstico y un tratamiento acorde a su caso particular. En este contexto, la implantación sistematizada de los cultivos de

leche en los Servicios de Microbiología de los hospitales puede ofrecer una solución para un buen porcentaje de casos.

### *II.5.5.2 Recogida, transporte y conservación de las muestras*

La recolección de una muestra representativa para el análisis microbiano es de suma importancia para obtener un diagnóstico correcto, ya que existen muchos factores relacionados con el muestreo que pueden afectar el resultado (Arroyo et al. 2011). La leche no es un fluido estéril, no obstante, se puede contaminar con microorganismos ambientales por lo que es muy importante dar instrucciones claras a la paciente para realizar una recogida adecuada de la muestra. A modo de ejemplo, el uso de bombas de extracción de leche no estériles y otros dispositivos para recoger las muestras está asociado a una alta concentración de algunas bacterias contaminantes (particularmente enterobacterias, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp. y bacterias Gram-negativas relacionadas) y levaduras (*Candida* spp.), que proceden del agua de lavado, de las manipulaciones o de otras fuentes, pero que no están relacionadas con las mastitis (Brown et al. 2005, Marín et al. 2009, Jiménez et al. 2017).

En general, se deben seguir las recomendaciones detalladas en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1ª (2ª edición) “*Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología*” (García-Lechuz et al. 2017), teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano siempre que las condiciones clínicas de la paciente lo permitan.
- La limpieza de la areola mamaria y el pezón antes de la recogida de la leche no disminuye la concentración bacteriana de la muestra.
- Las muestras se deben recoger inmediatamente antes de una toma y, si es posible, tras haber transcurrido al menos dos horas desde la toma anterior. El mejor momento para su recogida es la primera toma de la mañana (6’00 - 8’00 am).
- Tras la toma anterior a aquella en la que se vayan a recoger las muestras para el cultivo, no se debe aplicar ningún tipo de pomada o solución tópica (lanolina, antibióticos, antisépticos, antiinflamatorios ...) ni tampoco utilizar ningún tipo de accesorio (conchas...) que provoque un acúmulo de leche en contacto directo con areolas mamarias y pezones; en caso contrario, se deben lavar dichas partes del pecho con agua templada y jabón neutro, y secarlos con una toalla limpia o una toallita de un solo uso inmediatamente antes de la recogida.

- Inmediatamente antes de la recogida, la paciente debe lavarse las manos con agua caliente y jabón (o producto similar) y secárselas con una toalla limpia o una toallita de un solo uso.
- La recogida de muestras de leche se debe efectuar mediante extracción manual, sin la ayuda de ningún tipo de accesorio (pezoneras,...). En ningún caso se deben emplear bombas extractoras (sacaleches). Todos estos utensilios pueden ser una fuente importante de microorganismos ajenos a la glándula mamaria (por su manipulación y por los microorganismos que contiene el agua potable con la que se lavan o aclaran).
- Se deben desechar las primeras 4-5 gotas de leche.
- La recogida de leche se debe realizar en un recipiente de plástico estéril, de boca ancha, sin fugas y la paciente debe cerrarlo correctamente. Nunca se debe recoger la leche de recipientes intermedios (cucharas, biberones, vasos, botellas, etc.) donde la paciente haya depositado la leche previamente.
- Si los dos pechos están afectados, hay que recoger una muestra de cada uno en un envase independiente, empezando por el pecho que esté menos afectado.
- El volumen necesario para el cultivo de una muestra de leche es de 1 mL.

El transporte de las muestras al laboratorio debe realizarse lo antes posible. Si no pueden ser enviadas en las dos primeras horas tras su recogida, pueden conservarse en nevera (refrigeración, 4°C) hasta 24 h. Aunque la leche actúa como crioprotector para los microorganismos, únicamente se deben congelar cuando el transporte al laboratorio se retrase más de 2 h y no puedan ser conservadas en nevera. Las muestras deben procesarse con rapidez a su llegada al laboratorio y, una vez procesadas, pueden conservarse en nevera un máximo de 48 h para realizar, en caso que sea necesario, posibles confirmaciones de los resultados obtenidos.

Las muestras de leche que llegan al laboratorio deben cumplir con las normas establecidas para la aceptación de las muestras. Deben estar correctamente identificadas y acompañadas de su volante de petición, en papel o electrónico, perfectamente cumplimentado. Se deberá comunicar al laboratorio cualquier otra información que sea imprescindible para la interpretación de los resultados. No deben aceptarse las muestras sin identificar o en las que los datos no coincidan con los de la petición, ni aquellas muestras derramadas o recogidas en envases no estériles. En caso de rechazo, se informará detalladamente del motivo al clínico solicitante.

El cultivo de la leche es la técnica de elección para el diagnóstico de la infección mamaria durante la lactancia, no sólo porque permite identificar y

cuantificar los agentes causales y estudiar su sensibilidad a los antibióticos, sino porque permitirá conocer la epidemiología real de la infección. Este aspecto es importante teniendo en cuenta que el diagnóstico microbiológico de las mastitis constituye una novedad para la mayor parte de laboratorios de microbiología clínica. El diagnóstico final debe sustentarse en dos pilares: el cultivo y la sintomatología clínica.

#### *II.5.5.3. Medios de cultivo e inoculación*

La siembra de las muestras se realizará mediante inoculación directa (0,01-0,05 mL) de los medios de cultivo convencionales para bacterias Gram-positivas aerobias y facultativas (agar sangre, agar chocolate). Para obtener un recuento cuantitativo, la leche debe ser previamente homogeneizada, moviendo la muestra con suavidad para evitar la formación de espuma. La siembra de más de una muestra de leche por placa no es un procedimiento aceptable por la posibilidad de contaminación.

#### *II.5.5.4. Condiciones de incubación de los cultivos*

Los cultivos de leche deben ser incubados a 35-37°C en atmósfera aeróbica antes de ser interpretados. La mayoría de bacterias causantes de infección mamaria se pueden poner en evidencia en 18-24 h. En casos determinados, bacterias exigentes o cultivo negativo, podría ser necesario ampliar el periodo de incubación a las 48 h.

#### *II.5.5.5. Lectura de los cultivos*

Las placas deben ser examinadas para su valoración después del tiempo adecuado de incubación (este aspecto es importante para leches sembradas durante la tarde o noche), de la siguiente manera:

- **Cultivos sin crecimiento:** si las placas no presentaran crecimiento después del tiempo adecuado de incubación, el cultivo debe considerarse como negativo. En este caso, y también cuando aparezcan colonias muy pequeñas, se prolonga la incubación otras 24 o 48 h, para su posterior valoración.
- **Cultivos con crecimiento:** es importante discriminar entre especies causantes de mastitis (*S. aureus*, *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa-negativos, *Rothia* spp., *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *Corynebacterium* spp., *E. faecalis*,...) de aquellas especies que pueden formar parte de la microbiota mamaria y que no causan mastitis (*Lactobacillus* spp, *Lactococcus lactis*, otras bacterias lácticas, *Bifidobacterium* spp. *Propionibacterium* spp...) y también de aquellas que pueden proceder de la manipulación o lavado de dispositivos empleados para la recogida de la leche (*Enterobacteriaceae*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp, levaduras...) que no se

considerarán valorables, aunque, por supuesto, siempre deben considerarse en el contexto clínico del paciente.

Se deberán valorar los posibles morfotipos presentes y realizar el recuento de colonias para cada una de las posibles especies. Para la identificación se remite al Procedimiento de la SEIMC nº 37 (2ª edición) “*Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de Microbiología*” (Fernández et al. 2010). La utilización de la espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) reduce significativamente el tiempo en la emisión de los resultados. El informe final es de suma importancia al permitir ajustar el tratamiento empírico dado previamente a la paciente. Se realizarán las pruebas de sensibilidad a los antibióticos de los aislados clínicamente significativos según las normas de cada laboratorio (EUCAST, CLSI). Consultar la segunda edición de los Protocolos 38 y 39 de la SEIMC (Ardanuy et al. 2011, Calvo et al. 2011).

#### *II.5.5.6. Criterios para la interpretación e informe de resultados*

Al igual que sucede con el diagnóstico de infecciones asociadas a dispositivos biomédicos, en estas muestras se deben valorar como significativos los aislados de microorganismos que en otras muestras biológicas, como la piel, se considerarían como microbiota normal (estafilococos coagulasa negativa, corinebacterias, estreptococos de los grupos mitis y salivarius...). En condiciones fisiológicas, la concentración total de bacterias en muestras recogidas en las condiciones descritas anteriormente suele oscilar entre  $1-3 \times 10^2$  ufc/mL, con un límite máximo de, aproximadamente,  $6-8 \times 10^2$  ufc/mL. Cualquier valor por encima de esta concentración puede ser compatible con un cuadro de mastitis infecciosa. No obstante, el valor suele estar notablemente aumentado en estos casos. La concentración máxima de bacterias que se puede esperar en una muestra de leche con mastitis se sitúa es de  $1-3 \times 10^6$  ufc/mL. Por lo que respecta a *S. aureus*, esta especie no es frecuente en leche humana en condiciones fisiológicas (< 10%) y puede provocar mastitis a concentraciones mucho más bajas que las de las bacterias citadas anteriormente. También, es posible que existan cultivos mixtos (diversas especies de los grupos anteriores) en pacientes con mastitis, sin que este hecho indique una contaminación de las muestras.

La información emitida por el laboratorio debe ser exacta y clara, no dando lugar a falsas interpretaciones. Debe contener los elementos necesarios que ayuden al clínico en la interpretación del resultado. En cuanto al cultivo, si no se observa crecimiento o este no es significativo se informará como “*Cultivo negativo*” o “*Crecimiento no significativo*”. En ocasiones, este tipo de resultados puede deberse a la antibioterapia aplicada previamente a la recogida de las muestras. Si se observa un recuento significativo de un solo microorganismo, se informará del mismo con la identificación de la bacteria y la sensibilidad a los antibióticos apropiados. En los cultivos mixtos en los que se valoren todos los



morfotipos presentes en el medio de cultivo, se informará del recuento de cada microorganismo, su identificación y sensibilidad.

La presencia de una concentración baja ( $< 5 \times 10^2$  ufc/mL) de corinebacterias en mujeres con mastitis supurativas que aparecen incluso algunos meses después de finalizar la lactancia puede sugerir la presencia de granulomas generados por estas bacterias. Como se ha comentado anteriormente, la presencia de bacterias Gram-negativas (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp...) y levaduras (*Candida* spp.) suele estar asociada a un protocolo inadecuado de recogida de las muestras. En tales casos, pueden estar presentes en concentraciones muy elevadas ( $> 1 \times 10^4$  ufc/mL).

La irrupción de los estudios dedicados al microbioma humano ha revolucionado el conocimiento sobre la microbiología humana, su relación con la inmunología, la bioquímica o la neuroendocrinología, y su relevancia para la salud y la enfermedad. Actualmente, organismos tan relevantes como la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) admiten la existencia de una microbiota y un microbioma mucho más complejo del que se podía prever hace apenas unos años en prácticamente todas las mucosas y epitelios de un hospedador, incluyendo las glándulas mamarias (y, por ende, la leche). Este conocimiento es esencial en la elaboración o revisión de protocolos de microbiología clínica, que se van a tener que actualizar cada vez con mayor frecuencia para evitar que queden obsoletos.

#### II.5.6. Tratamiento de las mastitis

Los tratamientos pueden ser diversos (**Tabla 4**), incluyendo medidas de manejo y la modulación de la microbiota mamaria (Fernández et al. 2014a) pero, cuando el clínico opte por la prescripción de un antibiótico, sería aconsejable que la elección estuviese ajustada a la sensibilidad antibiótica de los agentes implicados, en lugar de la instauración de un tratamiento empírico (WHO, 2014). En el informe de la OMS correspondiente a 2014 sobre la vigilancia mundial de la resistencia a los antibióticos se puso de manifiesto que esta cuestión ha dejado de ser una posible preocupación futura para convertirse en un problema real que afecta al ámbito extrahospitalario y a hospitales de todo el mundo y complica en gran medida nuestra capacidad para tratar infecciones comunes. Entre las medidas que propone este organismo para el personal sanitario en la lucha contra las resistencias destacan: (a) prescribir y dispensar los antimicrobianos adecuados para el tratamiento de cada enfermedad; (b) prescribir y dispensar antibióticos solo cuando son realmente necesarios; y (c) buscar alternativas al empleo de antimicrobianos (vacunas, modulación de la microbiota...).

### II.5.6.1. Tratamiento empírico de las mastitis agudas

Ante un cuadro agudo, parece lógico y razonable iniciar un tratamiento antibiótico. Actualmente, se suele prescribir un beta-lactámico (cloxacilina o amoxicilina con/sin ácido clavulánico). En general, la opción más recomendable, en ausencia de cultivo, sería la combinación amoxicilina/ácido clavulánico (1000/62,5 mg) en comprimidos de liberación prolongada (Carrera et al. 2012).

**Tabla 4. Propuesta de tratamiento para los distintos tipos de mastitis.**

Tipo de mastitis	Tratamiento <sup>1</sup>
Agudas	<p><b>1. Antibiótico</b></p> <p>Amoxicilina/ácido clavulánico (1000/62,5 mg; cada 8-12 h; 7-10 días)</p> <p>Evitar cloxacilina (elevado porcentaje de cepas resistentes)</p> <p>Cefalosporinas</p> <p><b>2. Probiótico</b></p> <p><i>L. salivarius</i>, <i>L. fermentum</i>, otras especies (<math>1 \times 10^9</math> ufc; 3 veces al día; 14-21 días)</p> <p>Alternativa a antibióticos en mastitis agudas moderadas</p> <p>Complemento a antibióticos en mastitis agudas severas</p> <p><b>3. Antiinflamatorio</b></p> <p>Siempre en combinación con antibiótico y/o probiótico</p> <p>Si hay fiebre: alternar paracetamol e ibuprofeno (600 mg-1 g; 2-4 veces/día; 7 días). Si no hay fiebre: ibuprofeno (600 mg-1 g; 2-4 veces/día; 7 días)</p> <p><b>4. Quirúrgico</b></p> <p>Exclusivamente en el caso de formación de abscesos</p>
Subagudas	<p><b>1. Antibióticos</b></p> <p>Sólo en caso de ser ineficaz el tratamiento con probióticos</p> <p>Ciprofloxacino (750 mg, cada 12 h, 7-10 días)</p> <p>Cotrimoxazol</p> <p><b>2. Probiótico</b></p> <p>Igual que para las mastitis agudas. Tratamiento de elección en estos casos (junto a antiinflamatorio)</p> <p><b>3. Antiinflamatorio</b></p> <p>Siempre en combinación con antibiótico y/o probiótico</p> <p>Ibuprofeno (600 mg-1 g; 2-4 veces/día; 7 días)</p>

**Tabla 4. Propuesta de tratamiento para los distintos tipos de mastitis (continuación).**

Tipo de mastitis	Tratamiento <sup>1</sup>
Granulomatosas	<p><b>1. Antibiótico</b></p> <p>Elegir el antibiótico más liposoluble entre los que muestren eficacia en el antibiograma</p> <p><b>2. Probiótico</b></p> <p>Alternativa atractiva pero efecto desconocido</p> <p><b>3. Antiinflamatorio</b></p> <p>Siempre en combinación con antibiótico y/o probiótico</p> <p>Ibuprofeno (600 mg-1 g; 2-4 veces/día; 7 días)</p> <p><b>4. Quirúrgico</b></p> <p>Eliminación de las masas, fístulas y abscesos. En ciertos casos, reconstrucción de mama</p>
Subclínicas	<p><b>1. Probiótico</b></p> <p>Igual que para las mastitis agudas/subagudas</p> <p>Tratamiento de elección en estos casos (sólo o junto a antiinflamatorio)</p> <p><b>2. Antiinflamatorio</b></p> <p>En combinación con probiótico.</p> <p>Ibuprofeno (600 mg-1 g; 1-2 veces/día; 7 días)</p>

<sup>1</sup>Siempre es conveniente realizar un cultivo y antibiograma, por si la(s) cepa(s) causante(s) de la mastitis fuese(n) resistente(s) a los antibióticos propuestos.

La cloxacilina ha sido durante muchos años el antibiótico de elección para estos casos pero, actualmente, su eficacia es bastante limitada frente a las cepas de *S. aureus* causantes de mastitis. Conviene tener en cuenta que más del 50% de las cepas de *S. aureus* causantes de abscesos son resistentes a la meticilina (Moazzez et al. 2007). Muchas veces, el clínico opta por concentraciones bajas del principio activo al tratarse de una mujer lactante; sin embargo, suele ser mejor optar por una concentración elevada que actúe rápidamente y que minimice la generación de resistentes. Conviene tener en cuenta que la concentración de residuos de antibióticos en leche no es directamente proporcional a la concentración administrada. En este sentido, la información proporcionada por las bases de datos más fiables sobre medicamentos y lactancia (LactMed, *United States National Library of*

*Medicine*; e-lactancia; Servicio de Pediatría del Hospital de Denia) puede resultar muy útil para el facultativo (**Tabla 5**)

Medicamento	Nivel de riesgo <sup>1</sup>	Peso molecular <sup>2</sup> (daltons)	T <sub>máx</sub> <sup>3</sup> (h)	Unión proteínas <sup>4</sup>	T <sub>1/2</sub> <sup>5</sup> (h)	Índice leche/plasma <sup>6</sup>	Biodisponibilidad oral <sup>7</sup> (%)	Dosis terapéutica (mg/kg/día)	Dosis relativa <sup>8</sup> (%)
Amoxicilina	0	365	1,5	18	1,7	0,04	89	0,1	0,4
Amoxicilina+ácido clavulánico	0	365	1,5	18	1,7	0,04	89	0,1	0,4
Cloxacilina	0	436	2	90	3	-	60	0,06	0,36
Ciprofloxacino	0	331	2,3	40	4	2	85	0,6	7,2
Cotrimoxazol	1	-	4	-	10	-	100	-	-
Paracetamol	0	151	2	10	3	1,9	85	0,9	1-4
Ibuprofeno	0	206	3	90	2,5	0,01	80	0,075	0,2

El tratamiento con beta-lactámicos puede conducir a tres situaciones: (a) que el tratamiento sea eficaz y que el problema se solucione completamente aunque, desafortunadamente, no es la situación más frecuente; (b) que la(s) cepa(s) de *S. aureus* implicada(s) sea(n) resistente(s), de tal manera que el cuadro no sólo no mejora sino que se mantiene e, incluso, puede empeorar al crearse un ambiente propicio para el crecimiento selectivo de dichas cepas (ver siguiente sección); y (c) que sea eficaz frente a *S. aureus* pero que seleccione el crecimiento de estafilococos coagulasa-negativos o estreptococos. Este último caso suele ser bastante común, de tal manera que la mastitis aguda se transforma en subaguda y, a partir de ese momento, habría que tratarla como tal.

**Tabla 5. Nivel de riesgo y parámetros cinéticos de diversos medicamentos empleados en el tratamiento de las mastitis.** Fuente: e-lactancia (Servicio de Pediatría, Hospital de Denia; <http://www.e-lactancia.org>)

<sup>1</sup>Nivel de riesgo: (a) Nivel 0: sustancia con seguridad demostrada para el lactante. Producto seguro, compatible con la lactancia; (b) Nivel 1: sustancia que podría provocar efectos adversos muy leves sobre el lactante o de la que no hay datos publicados pero sus características físico-químicas y farmacocinéticas de absorción, distribución y eliminación del producto hacen muy poco probable la aparición de efectos adversos. Producto moderadamente seguro.

<sup>2</sup>Peso molecular: A mayor peso molecular (>500 daltons), mayor dificultad de paso a leche.

<sup>3</sup>Tiempo máximo: Tiempo necesario (h) para alcanzar la concentración máxima desde la administración. Es justo el momento en el que hay que evitar dar el pecho (mejor tomar el medicamento en cuestión inmediatamente después de dar el pecho)

<sup>4</sup>Unión proteínas: Porcentaje de fijación de la sustancia a las proteínas plasmáticas (baja:<50%, media: 50-80%; alta:>80%). A mayor fijación (sobre todo por encima del 80%), más dificultad de paso a leche.

<sup>5</sup>T<sub>1/2</sub>: Semivida de eliminación. Es el tiempo que tarda la concentración plasmática de una sustancia en reducirse a la mitad. Cuanto más corto es (pocas horas), más pronto se elimina y, por tanto, más seguro para la lactancia.

<sup>6</sup>Índice leche/plasma: Relación de concentración de una sustancia en la leche respecto a su concentración en el plasma. Cuanto menor es esta relación (<1), menos concentración alcanza el medicamento en leche materna.

<sup>7</sup>Biodisponibilidad oral: Porcentaje de sustancia que alcanza la circulación sistémica tras la administración oral. Aunque no se disponen de datos para lactantes, se pueden extrapolar. Cuanto menor sea el porcentaje de biodisponibilidad oral, menos posibilidad de que la sustancia que ha pasado a la leche sea absorbida por el lactante.

<sup>8</sup>Dosis relativa del lactante: Porcentaje de la dosis materna de un medicamento que llega al lactante. Se consideran seguras cifras inferiores al 10%.

### II.5.6.2. Tratamiento de las mastitis subagudas

En general, los agentes causantes de mastitis subagudas son más resistentes a la antibioterapia pero, afortunadamente, responden bastante bien al tratamiento con probióticos. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se suministran en cantidades adecuadas, ejercen efectos beneficiosos sobre un hospedador y tienen diversas aplicaciones, reales o potenciales, en el binomio madre-hijo (Rodríguez, Dalmau 2007b, Rodríguez, Dalmau 2007a). Recientemente, diversos ensayos clínicos han demostrado que ciertos lactobacilos aislados de leche humana representan una alternativa más eficaz que los antibióticos para el tratamiento de las mastitis, careciendo de los efectos secundarios de aquellos (candidiasis, trastornos digestivos...). El tema de los probióticos se trata en otra sección de la introducción mientras que su empleo en la prevención y tratamiento de las mastitis se aborda detalladamente en la discusión de esta Tesis Doctoral.

En los casos en los que el tratamiento probiótico (primera opción) no curse adecuadamente, se puede optar por un antibiótico (segunda opción). Sin embargo, como se ha comentado, los  $\beta$ -lactámicos no suelen ser muy eficaces frente a los agentes etiológicos de este tipo de mastitis. Por lo tanto, hay que recurrir a otros antibióticos que tradicionalmente no se habían tenido en cuenta durante la lactancia, como el ciprofloxacino. La capacidad de este antibiótico para penetrar y difundirse en las biopelículas formadas por *S. epidermidis* es mayor que la de los  $\beta$ -lactámicos (Singh et al. 2010). Hace años hubo controversia sobre el uso de las quinolonas en lactancia debido a posibles efectos adversos sobre el cartílago articular de los niños; sin embargo, pronto se demostró que el ciprofloxacino, no sólo carece de dicho efecto para la especie humana, sino que se trata de uno de los antibióticos más seguros en neonatología (Gurpinar et al. 1997, Dutta et al. 2006, Adefurin et al. 2011, Kaguelidou et al. 2011). En este sentido, actualmente se considera un medicamento de riesgo 0 en lactancia (Kaplan, Koren 2015). Así, el tratamiento de una mujer lactante por vía oral con una dosis de 750 mg cada 12 h significaría que un niño amamantado recibiría una concentración máxima de 0,57 mg/kg al día, una dosis muy inferior a la habitual (10-40 mg/kg al día) cuando se tratan directamente los neonatos con el mismo antibiótico (van den Oever et al. 1998, Belet et al. 2004, Drossou-Agakidou et al. 2004, Dutta et al. 2006). Adicionalmente, la pequeña cantidad que llega al niño apenas se absorbe debido a la interferencia causada por el calcio de la propia leche (Belet et al. 2004). Finalmente, hay que advertir que los suplementos de hierro (frecuentes durante la lactancia) disminuyen la biodisponibilidad de ciprofloxacino, reduciendo su eficacia.

El cotrimoxazol, sólo o en combinación, podría ser otra opción ya que suele ser activo frente a estafilococos mientras que las penicilinas podrían ser una buena opción en aquellos casos (por otra parte escasos) en los que únicamente se detecten estreptococos en la muestra analizada. En contraste,

otros antibióticos como la eritromicina o la fosfomicina suelen ser poco efectivos frente a estos agentes, incluso cuando el resultado del antibiograma indica que son teóricamente sensibles.

### II.5.6.3. ¿Por qué los antibióticos fracasan frecuentemente en el tratamiento de las mastitis?

Inicialmente, la penicilina constituyó el tratamiento de elección contra infecciones por estafilococos pero las resistencias se generalizaron rápidamente y el testigo pasó a las penicilinas resistentes a penicilasas de bajo (oxacilina, nafcilina, meticilina, dicloxacilina, cloxacilina), medio (amoxicilina) o, más recientemente, amplio espectro (amoxicilina + ácido clavulánico). Actualmente, el porcentaje de mastitis que se curan con antibioterapia es bajo, una situación que también se observa en medicina veterinaria. Este hecho se debe a tres razones fundamentales: (1) El aumento de cepas resistentes a los antibióticos; (2) la formación de *biofilms*; y (3) la coexistencia de cepas con distinta sensibilidad a los antibióticos.

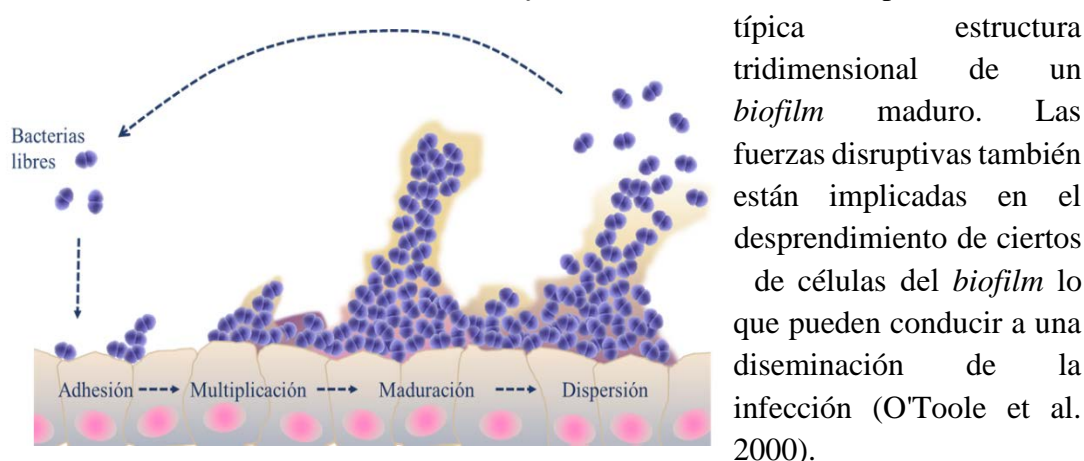
Por lo que respecta al primer punto, resulta llamativo que la resistencia a la meticilina y afines, antibióticos que frecuentemente constituyen la primera elección en infecciones estafilocócicas, sea del 75–90% entre los aislados hospitalarios de *S. epidermidis* y del 40–60% entre los de *S. aureus* (Diekema et al. 2001). En algunos países, como Holanda, la implantación de unos programas muy estrictos de higiene ha conseguido reducir notablemente la prevalencia de las cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina en los hospitales (Vos et al. 2005); sin embargo, estas medidas han sido mucho menos exitosas frente a las cepas de *S. epidermidis* resistentes a la meticilina (van Pelt et al. 2003).

La alta resistencia a la meticilina se encuentra codificada en elementos genéticos móviles y, más concretamente, en el *cassette* cromosómico estafilocócico *SCCmec*. El *SCCmec* contiene el gen *mecA*, que codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a), con una afinidad por la meticilina bastante menor que la de otras PBPs (Hiramatsu et al. 2001). Hasta el momento, se han identificado 10 elementos *SCCmec* diferentes en *S. epidermidis*, siendo el más abundante el *SCCmec* de tipo IV (36%) (Ma et al. 2002, Miragaia et al. 2005). La presencia de este tipo es relevante ya que, a diferencia de los otros, no significa un coste metabólico para la célula bacteriana que lo porta y, en consecuencia, se puede extender en ausencia de la presión selectiva impuesta por la exposición al antibiótico. Por otra parte, existen evidencias que demuestran que tanto los *SCCmec* como otros elementos genéticos móviles actualmente extendidos en *S. aureus* fueron originalmente adquiridos a partir de cepas de *S. epidermidis* (Schwalbe et al. 1987).

En cualquier caso, los genes que confieren resistencia específica frente a antibióticos están ampliamente extendidos en *S. epidermidis* (Otto 2009),

especie que constituye un auténtico reservorio para otros estafilococos. Además, las cepas de *S. epidermidis* han adquirido resistencia a muchos otros antibióticos, incluyendo gentamicina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, flouroquinolonas y sulfonamidas (Rogers et al. 2009). A pesar de ello, el 80% de las infecciones asociadas a catéteres pueden ser tratadas con otros antibióticos, como la vancomicina, sin necesidad de la retirada del catéter (Raad et al. 2007). Este podría ser el caso de las mastitis ya que la glándula mamaria durante la lactancia realmente se podría equiparar a un complejísimo “*sistema de catéteres*”; sin embargo, la vancomicina es uno de los últimos antibióticos eficaces frente a estafilococos multirresistentes y su uso es exclusivamente hospitalario.

Tampoco se puede asegurar la eficacia de la antibioterapia cuando, en un antibiograma, aparecen una serie de antibióticos a los que, en teoría, es sensible el agente causante. Las pruebas de resistencia a antibióticos se realizan en condiciones que poco tienen que ver con las que se encuentran en una mastitis, infección que se suele caracterizar por la formación de densos *biofilms* en los conductos galactóforos. Los *biofilms* son aglomeraciones de microorganismos firmemente adheridos a una superficie, con una fisiología y una arquitectura muy características, que forman la base de la gran resistencia que presentan a muchos antibióticos y a los mecanismos de defensa del hospedador (Costerton et al. 1999). El proceso de formación de un *biofilm* empieza con la adhesión inicial de las células bacterianas a una superficie y su subsiguiente agregación en estructuras multicelulares (**Fig. 13**). En consecuencia, su desarrollo requiere fuerzas adhesivas tanto para la colonización de la superficie como para el establecimiento de interacciones célula-célula. Paralelamente, se necesitan fuerzas disruptivas para la formación de los canales que suministrarán los nutrientes a todas las células del *biofilm*; ambas fuerzas son responsables de la



típica estructura tridimensional de un *biofilm* maduro. Las fuerzas disruptivas también están implicadas en el desprendimiento de ciertos de células del *biofilm* lo que pueden conducir a una diseminación de la infección (O'Toole et al. 2000).

**Figura 13. Formación de un *biofilm* bacteriano.** El tratamiento convencional de las mastitis es mediante el uso de antibióticos, pero debido a que las bacterias productoras de esta infección son capaces de formar *biofilms* en los conductos galactóforos, son capaces de protegerse frente a ellos.



Los genomas de los estafilococos, en general, y de *S. epidermidis*, en particular, muestran una sustancial adaptación al modo de crecimiento en forma de biopelículas, incluyendo la regulación negativa de procesos celulares básicos, como la biosíntesis de ácidos nucleicos, de proteínas y de la pared celular (Yao et al. 2005). Estos cambios en la regulación génica explican por qué la actividad de muchos antibióticos cuya diana son las células bacterianas que crecen activamente (por ejemplo, penicilinas o aminoglucósidos) es muy limitada frente a los *biofilms* de *S. epidermidis* (Duguid et al. 1992, Khardori et al. 1995). Además, la capacidad de penetración en un *biofilm* varía dependiendo del antibiótico; así, recientemente se ha observado que la capacidad de la oxacilina, la cefotaxima y la vancomicina para penetrar en *biofilms* de *S. aureus* o *S. epidermidis* es muy reducida, en contraste con la de la amikacina o el ciprofloxacino (Singh et al. 2010).

#### II.5.6.4. Antiinflamatorios

Cuando la respuesta inmunitaria frente a un microorganismo es demasiado intensa, la propia reacción del hospedador se convierte en corresponsable de la patología y la sintomatología. En tales casos, el problema suele radicar en una inflamación perjudicial para el órgano afectado, independientemente de que el microorganismo haya podido ser controlado o no (Casadevall, Pirofski 2003). Entre los ejemplos de este fenómeno se incluyen enfermedades estafilocócicas, como el síndrome de shock tóxico, cuya patogenia se basa en la excesiva activación de la respuesta inmunitaria frente a una toxina estafilocócica. La situación es similar en las mastitis agudas causadas por *S. aureus* y también, en menor medida, en las subagudas. En estas infecciones, la terapia antimicrobiana, por sí sola, fracasa frecuentemente porque no reduce la respuesta inflamatoria. De hecho, las nuevas direcciones en el tratamiento de enfermedades infecciosas, que se caracterizan por una intensa inflamación, implican el empleo de terapias antiinflamatorias complementarias a las antiinfecciosas (Pirofski, Casadevall 2012).

En consecuencia, la resolución de las mastitis de cualquier tipo en un tiempo prudencial requiere que el tratamiento antibiótico se asocie con un antiinflamatorio no esteroideo. En las mastitis agudas con fiebre elevada es recomendable alternar paracetamol (650 mg o 1 g) e ibuprofeno (600 mg). Ambos son de riesgo 0 en lactancia y se pueden administrar cada 6 h. Si no existe fiebre, o ya ha desaparecido, habría que optar únicamente por el ibuprofeno ya que su potencial antiinflamatorio es superior al del paracetamol. En cualquier caso, habría que evitar el empleo de corticoides ya que, aunque pueden aliviar momentáneamente la sintomatología, pueden favorecer una progresión de la infección.



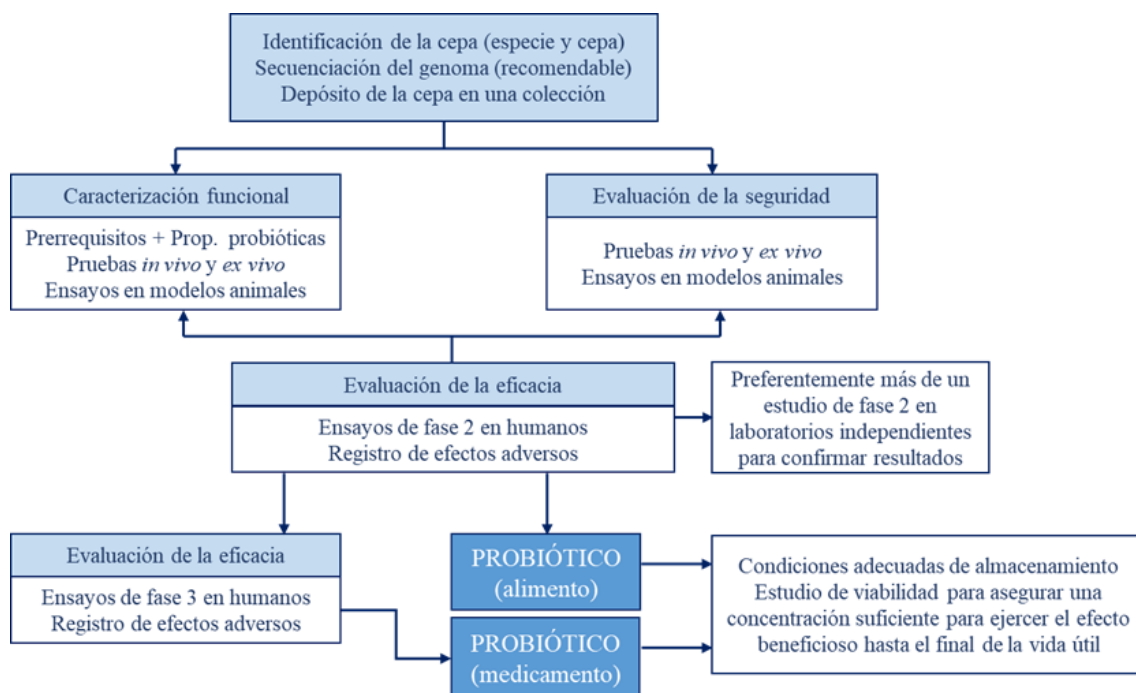
## II.6. PROBIÓTICOS: DEL LABORATORIO AL CONSUMIDOR

---

Los probióticos son “*microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del hospedador*” (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO WHO) 2006). Esta definición ha sido ampliamente aceptada por la comunidad científica mundial y ha sido recogida en los consensos de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP) y de la *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISSAP) (Guarner et al. 2010, Hill et al. 2014). Parece conveniente definir aquí los conceptos de prebiótico y de simbiótico, relacionados con el de probiótico y cuya homofonía podría llevar a confusión. Los prebióticos son “*ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo*” (Pineiro et al. 2008). Los simbióticos son “*mezclas de uno o más probióticos con uno o varios compuestos prebióticos*” (<http://www.sepyp.es/es/wiki>).

La investigación y el desarrollo comercial de productos que contienen probióticos y prebióticos han progresado de manera significativa en los últimos años (Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP) 2016). Este avance se ha visto respaldado por los logros científicos y clínicos que están aportando las evidencias que sustentan los beneficios para la salud de estos productos. Paralelamente, también ha aumentado su demanda por parte de los consumidores, que son cada vez más conocedores de la importancia de nuestra microbiota en la salud. Desafortunadamente, algunas compañías han aprovechado esta coyuntura para aplicar el término “*probiótico*” a productos que no encajan en este concepto y/o cuyos presuntos beneficios carecen de cualquier base científica. Este mal uso, intencionado o no, se ha visto favorecido por la ausencia, hasta principios del siglo XXI, de un consenso internacional sobre la metodología para evaluar la eficacia y seguridad de estos productos.

En 2001, una comisión de expertos internacionales convocados de forma conjunta por la FAO y la OMS para la evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos reconoció la necesidad de establecer directrices para la evaluación de la eficacia y seguridad de los probióticos (Expert Consultation on Evaluation of Health FAO/WHO 2001). En 2002, y recogiendo el guante de la comisión, un grupo de trabajo mixto de la FAO y la OMS elaboró unas directrices con los requerimientos mínimos necesarios para que a un producto se le pudiera otorgar el apelativo de probiótico (FAO/WHO 2002) (**Fig. 14**).



**Figura 14. Directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos.**

Modificado de Rodríguez 2015

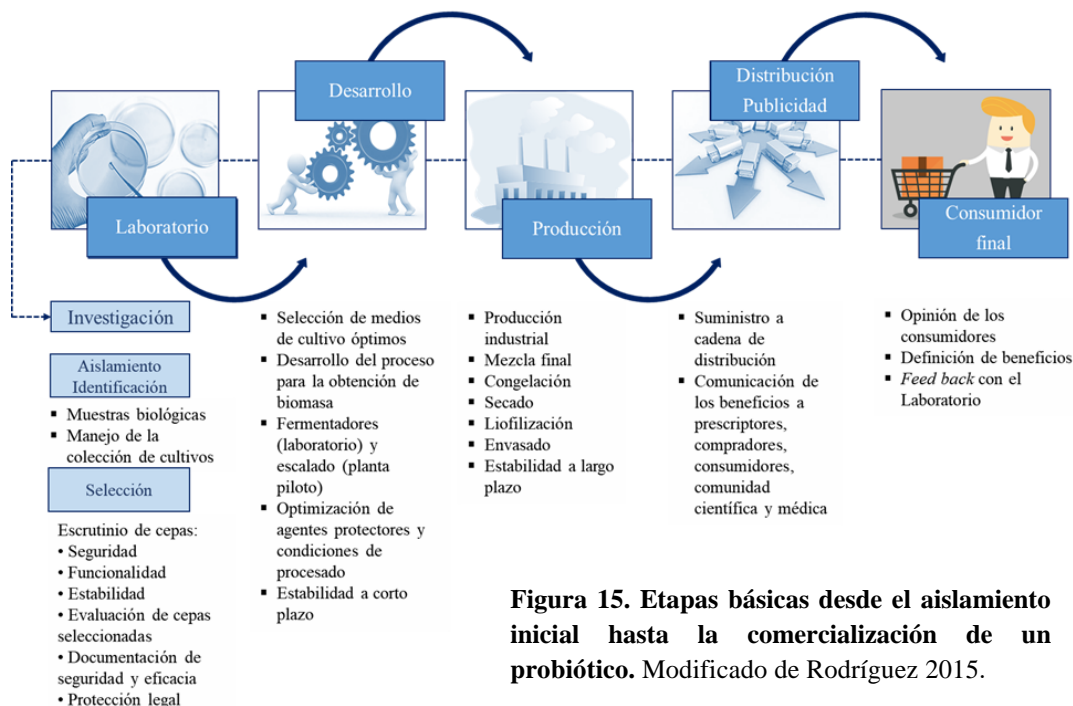
El proceso que va desde la selección inicial de cepas hasta la comercialización de un probiótico eficaz para un objetivo específico no resulta sencillo (Rodríguez 2015) (**Fig. 15**). Tiene que contemplar diversos aspectos (científicos, clínicos, tecnológicos, normativos, económicos, comunicativos...) que, aunque en muchas ocasiones no son fáciles de conjugar, pueden y deben ser compatibles entre sí. Recientemente, se ha empleado el término “*marco probiótico*” para hacer referencia a todos los grupos y sectores implicados y con el objetivo común de que el conocimiento existente sobre los probióticos se traduzca en alimentos o suplementos que supongan un beneficio para la sociedad (Hill et al. 2014) (**Fig. 16**).

De los miles de cepas aisladas cada año por su presunto potencial probiótico en los laboratorios de todo el mundo, muy pocas pasan a una fase de desarrollo industrial y muchas menos aun las que consiguen un hueco en los estantes de una farmacia, parafarmacia o establecimiento alimentario. En este capítulo, se revisarán los principales aspectos que se deben tener en cuenta en el camino que debe seguir una cepa desde su aislamiento inicial hasta su comercialización.

### II.6.1. Identificación de la cepa

La identificación de un aislado a nivel de especie y cepa es un requisito esencial para cualquier aislado que se pretenda comercializar. La asignación de un aislado a una especie u otra no es banal; por ejemplo, la evaluación del riesgo ante la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es mucho más sencilla para aquellas que, sobre la base de una historia de uso seguro, gozan de presunción cualificada de seguridad (QPS; del inglés, *Qualified Presumption of*

*Safety*) (EFSA BIOHAZ Panel 2013). La lista QPS se revisa anualmente, incorporando nuevas unidades taxonómicas si los datos disponibles así lo avalan. En consecuencia, es probable que en el futuro se incluyan géneros y especies (p.e.: *Roseburia* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*...) que no se han empleado hasta la fecha como probióticos pero a las que los estudios sobre el microbioma humano están vinculando con claros efectos beneficiosos para la salud.

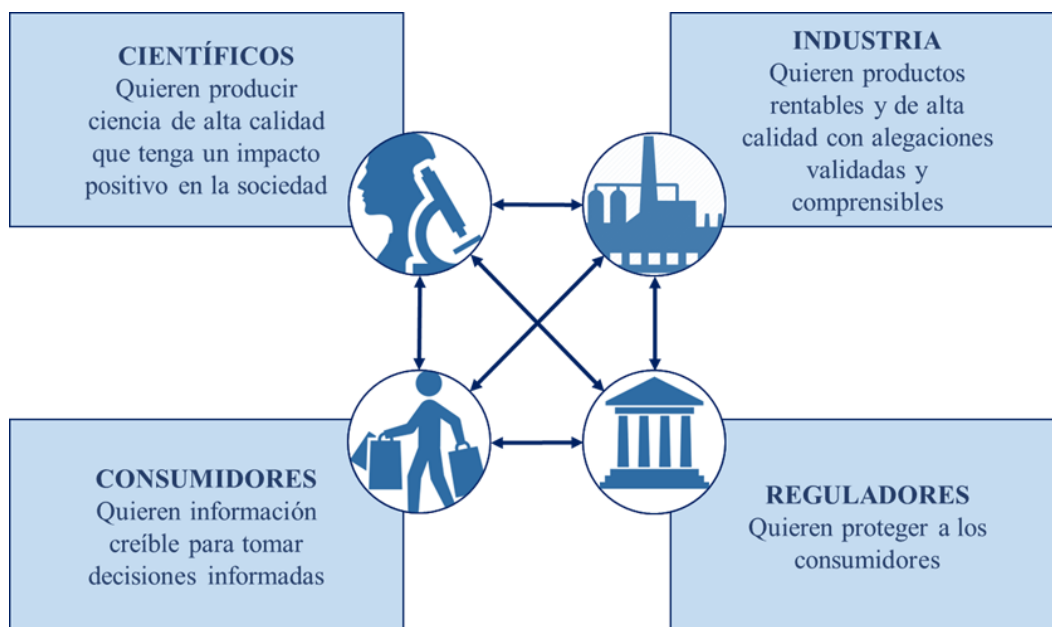


**Figura 15. Etapas básicas desde el aislamiento inicial hasta la comercialización de un probiótico.** Modificado de Rodríguez 2015.

Como cualquier otra disciplina, la taxonomía de bacterias y levaduras está en constante evolución y la determinación de la especie a la que pertenece un aislado debe realizarse (y, eventualmente, reevaluarse) con la metodología más actualizada posible. Existen diversas fuentes en las que se puede consultar el listado actualizado de especies taxonómicamente válidas (p.e.: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*). Aunque las pruebas fenotípicas (fermentación de carbohidratos, actividades enzimáticas...) fueron muy útiles cuando no existían otros métodos alternativos, actualmente no son válidas para la identificación de especies ya que su capacidad de resolución es claramente insuficiente; de hecho, la herencia del uso de métodos de identificación inadecuados es la principal causa mundial de mal etiquetado de productos probióticos (Huys et al. 2006).

Las pruebas fenotípicas fueron reemplazadas rápidamente por diversas técnicas moleculares, basadas en la detección de huellas genéticas (*fingerprinting*) o en la secuenciación de diversos genes. Entre ellas, la secuenciación parcial o completa del gen 16S rRNA se ha convertido, prácticamente, en el método estándar de identificación. Sin embargo, este abordaje posee algunos inconvenientes, como la existencia de secuencias no contrastadas en las bases de datos (EMBL/GenBank/DDBJ) o su incapacidad para discriminar entre (sub)especies estrechamente relacionadas, como las que

se incluyen dentro del grupo *Lactobacillus plantarum* o del grupo *Lactobacillus paracasei*. En este sentido, el uso de genes constitutivos (*housekeeping*), como *pheS*, *rpoA*, *atpD*, *tuf*, *groEL* o *recA*, o su combinación con el gen 16S rRNA ofrece una mayor capacidad discriminatoria. En cualquier caso, es inaceptable prolongar el uso de nomenclatura obsoleta o confusa en las etiquetas de los productos, a pesar de que existen ejemplos en este sentido en el mercado probiótico actual (p.e.: *Lactobacillus biphidus* en vez de *Bifidobacterium bifidum*; *Lactobacillus sporogenes* en lugar de *Bacillus coagulans*).



**Figura 16.** El “marco probiótico” y relaciones entre los sectores implicados en el campo de los probióticos. Modificado de Hill y Guarner 2014 y Rodríguez 2015.

La identificación de un aislado a nivel de cepa es igualmente relevante. La capacidad para identificar una cepa específica en una matriz o para diferenciarla entre otros probióticos o entre los integrantes de la microbiota nativa de un hospedador es esencial ya que posibilita su trazabilidad en pruebas laboratoriales, ensayos clínicos, estudios epidemiológicos (incluyendo posible implicación en efectos adversos) y durante todo el proceso de producción y comercialización. Por otra parte, es habitual que la empresa interesada en una cepa la quiera proteger mediante una patente que cubra sus posibles aplicaciones. Para ello, tendrá que depositar la cepa en una colección de referencia como, por ejemplo, la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) o la *American Type Culture Collection* (ATCC), bajo las condiciones del Tratado de Budapest. En este caso, la capacidad para diferenciar la cepa es una herramienta útil para detectar un posible uso ilegal por parte de un tercero.

La identificación a nivel de cepa también es deseable si existen efectos beneficiosos específicamente asociados a esa cepa. En muchos documentos,

incluyendo el consenso de la SEPyP (Guarner et al. 2010), se considera que los efectos saludables demostrados para una cepa microbiana específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas de la misma especie; sin embargo, se trata de un aspecto que se debería revisar ya que algunos efectos (y los mecanismos que los sustentan) están ampliamente distribuidos entre especies pertenecientes a distintos géneros, otros son frecuentes entre las distintas cepas de una misma especie y, finalmente, otros son más raros y sólo se pueden asociar a unas pocas cepas dentro de una especie determinada (Hill et al. 2014) (**Fig. 17**).



**Figura 17. Tipos de efectos distribuidos en los probióticos.** Modificado de Hill y Guarner 2014 y Rodríguez 2015.

A pesar de la disponibilidad de diversas técnicas de genotipado, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, del inglés *Pulse Field Gel Electrophoresis*) sigue siendo considerada la de elección para diferenciar cepas, sin olvidar que la presencia de plásmidos y megaplásmidos puede estar asociada a propiedades que diferencien una cepa frente a otras parecidas de la misma especie. La secuencia del genoma completo (incluyendo los elementos extracromosómicos) es la mejor fuente de información posible para la identificación de una especie y cepa, además de proporcionar información muy valiosa sobre su seguridad, funcionalidad y propiedades de interés tecnológico. Actualmente, la genómica funcional ya facilita la selección de cepas para aplicaciones concretas y será un abordaje común en un futuro próximo (Douillard, de Vos 2014). El abaratamiento de los costes de secuenciación hace que sea económicamente accesible para las empresas y en el futuro se convertirá en un requisito para cualquier cepa que se quiera comercializar.

## II.6.2. Seguridad de la cepa

### II.6.2.1. Consideraciones generales

La evaluación de la seguridad de los probióticos es, obviamente, un requisito imprescindible en el proceso de selección que empieza, como se ha comentado anteriormente, con una correcta identificación taxonómica. Los microorganismos utilizados como probióticos incluyen levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y bacterias de diferentes géneros (*Lactobacillus*,

*Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*), algunas de las cuales forman parte de la microbiota autóctona de los hospedadores a los que van dirigidas y otras no. Por otra parte, los probióticos se han empleado en un abanico muy amplio de situaciones, que incluye personas sanas, personas sanas pero en una situación sensible (bebés, mujeres embarazadas o lactantes, ancianos...) y personas con distintos tipos de patologías y su grado de severidad. En consecuencia, la evaluación de la seguridad debe tener en cuenta, entre otros factores, el microorganismo en cuestión, la forma de administración, el nivel de exposición, el estado de salud del huésped y las funciones fisiológicas que pueden desempeñar en el mismo (Sanders et al. 2010).

Globalmente, los casos en los que se ha podido establecer una relación entre el consumo de un probiótico y un efecto adverso son muy escasos y han afectado a personas con una barrera intestinal muy alterada. Esta baja incidencia epidemiológica es especialmente destacable teniendo en cuenta el amplio uso de este tipo de productos (Boyle et al. 2006, Cannon et al. 2015). Por ejemplo, el riesgo de infección por *Lactobacillus* es de aproximadamente un caso por cada 10 millones de personas mientras que, en general, el riesgo de lactobacilemia se considera como “inequívocamente insignificante” (Salminen et al. 2002, Borriello et al. 2003, Bernardeau et al. 2008). En tales casos, las especies más implicadas hasta la fecha han sido *Lactobacillus rhamnosus* (Rautio et al. 1999, Mackay et al. 1999), *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (generalmente asociada a la presencia de catéteres venosos centrales) (Hennequin et al. 2000) y *Bacillus subtilis* (Richard et al. 1988, Oggioni et al. 1998, Spinosa et al. 2000).

El hecho de que no se hayan observado efectos secundarios (y sí efectos beneficiosos) en la inmensa mayoría de los ensayos clínicos en los que se han administrado probióticos a hospedadores inmunocomprometidos, incluyendo personas positivas al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), niños prematuros de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer y ancianos enfermos, confirma la escasa patogenicidad de los probióticos, incluso en situaciones favorables para infecciones por microorganismos oportunistas (Bernardeau et al. 2008, Snyderman 2008, Trois et al. 2008, AlFaleh, Anabrees 2013, Moles et al. 2015).

A pesar de ello, la cuestión de la seguridad resulta primordial en personas con enfermedades graves, especialmente tras la observación de que la administración de un probiótico multiespecie a pacientes con pancreatitis aguda estaba asociada a una mortalidad más elevada que la del grupo control (16 y 6%, respectivamente) (Besselink et al., 2008). Un análisis de los subgrupos de pacientes reveló que el probiótico tenía efectos beneficiosos en los pacientes moderadamente enfermos pero negativos en los pacientes críticos. No se observó translocación de ninguna de las cepas del producto probiótico a la circulación



sistémica y todo parece indicar que los efectos adversos (mayor tasa de isquemia intestinal y de mortalidad) se debieron a un exceso de carga oxidativa sobre un sistema REDOX que ya estaba muy alterado, provocando un aumento del daño inducido por estrés oxidativo e isquemia (Ammori, 2003).

En teoría, los probióticos podrían producir cuatro tipos de efectos adversos (Marteau 2002): (1) infectividad o patogenicidad; (2) producción de metabolitos no deseables; (3) excesiva inmunoestimulación o inmunodepresión en individuos sensibles; y (4) posibilidad de transmisión de genes que confieran resistencia a antibióticos.

#### II.6.2.2. Patogenicidad

Resulta muy difícil evaluar posibles factores de virulencia en aquellos grupos bacterianos para los que no se tiene constancia de ningún miembro patógeno. Hasta la fecha, no se ha hallado ningún gen inequívocamente relacionado con patogenicidad en las especies de los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, incluyendo los aislados asociados con sepsis u otros efectos adversos (Vesterlund et al. 2007). Entre los factores que se han propuesto para explicar su implicación en tales casos están los mecanismos que permiten su adherencia a las células del hospedador (que facilitarían su translocación), la degradación de mucinas (que les proporciona metabolitos para su crecimiento), la actividad hidrolasa de sales biliares (que facilita su supervivencia en el entorno intestinal) o la resistencia a los mecanismos de defensa innatos. Sin embargo, se trata de características que, en general, contribuyen a la colonización de las mucosas y, como tales, son compartidas por gran parte de la microbiota natural.

El proceso de infección e invasión implica un primer contacto o adhesión entre las células bacterianas y las células epiteliales, una translocación a través del epitelio intestinal y una proliferación indiscriminada que puede acabar en un absceso hepático, una endocarditis o una sepsis. Por este motivo, se ha sugerido que el potencial de adhesión y translocación de una cepa forme parte de la evaluación de seguridad de los probióticos. No obstante, se trata de aspectos claramente controvertidos. En este sentido, la capacidad de adhesión se ha considerado como una posible característica probiótica ya que puede propiciar la colonización del epitelio diana, la mejora de las interacciones neuro-inmunológicas, la ocupación de receptores (en detrimento de los patógenos) y el fortalecimiento de la barrera intestinal (Huys et al. 2013).

La translocación también tiene numerosos matices; por una parte, existe una translocación bacteriana “infecciosa”, que implica una tasa de translocación elevada, que está habitualmente asociada a bacterias patógenas (cepas enteroinvasivas de *E. coli*, *Listeria monocytogenes*...), que suele coincidir con una alteración de la barrera intestinal y/o del sistema inmunitario y que conduce a una situación patológica; por otra parte, la translocación “controlada”

constituye un proceso fisiológico selectivo y altamente regulado que sucede continuamente en individuos sanos, que implica una tasa baja de translocación y que resulta fundamental para la homeostasis de un individuo (Pérez et al. 2007, Rodríguez 2014). Por lo tanto, el hecho de que una cepa sea capaz de translocar de una forma controlada no sólo no es motivo para rechazar una cepa sino que incluso podría constituir una propiedad probiótica relevante.

En cualquier caso, existen muchas dudas sobre la validez de las pruebas *in vitro* para predecir la adhesión y translocación *in vivo* de una cepa ya que, dependiendo del estado fisiológico de las bacterias, los diferentes tipos de ensayos, las diferentes líneas celulares empleadas y las diferencias entre laboratorios, los resultados para una misma cepa pueden variar notablemente.

En contraste con lactobacilos y bifidobacterias, se han descrito numerosos factores de virulencia (hemolisina, gelatinasa, DNasa...) en el género *Enterococcus* y, especialmente, en las especies *E. faecalis* y *E. faecium* (Franz et al. 2001, Eaton, Gasson 2001) aunque no existe consenso sobre un procedimiento o método que permita diferenciar las cepas patógenas de las no patógenas. Actualmente, no están incluidas en el listado QPS por lo que, como otros microorganismos en esa misma situación, la evaluación de su seguridad debe realizarse demostrando la ausencia de factores de virulencia cepa a cepa. En el caso de las especies del género *Bacillus* empleadas como probióticos e incluidas en el listado QPS (p.e.: *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. subtilis*), se debe demostrar la ausencia de actividad toxigénica (ausencia de genes *Hbl* y *Nhe* y de citotoxicidad) (EFSA BIOHAZ Panel 2013, Duc le et al. 2004).

### II.6.2.3. Producción de D-lactato

En el pasado, algunas autoridades consideraron que la producción del isómero D del ácido láctico es una propiedad a tener en cuenta para la evaluación de la seguridad de los probióticos, especialmente para su uso en la población infantil. Sin embargo, desde el punto de vista científico, se trata de una propiedad prácticamente irrelevante para determinar la seguridad de un aislado ya que muchas de las especies autóctonas del tracto gastrointestinal humano, incluyendo algunas ampliamente empleadas como probióticos en pediatría (p.e.: *Lactobacillus reuteri*), producen ácido D-láctico. También es ampliamente aceptado que la ingestión de yogur, que contiene elevadas concentraciones de este isómero debido a la actividad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, no supone un riesgo para la salud infantil. En este sentido, todo parece indicar que no existe ninguna razón para evitar el uso como probióticos de lactobacilos autóctonos humanos sobre la base de los estereoisómeros del ácido láctico que producen (ISAPP 2003). De hecho, hasta la fecha, no se ha descrito ningún caso de acidosis por ácido D-láctico en ningún ser humano sano, independientemente de su edad (Connolly, Lönnardal 2003). Los ensayos clínicos en los que se han administrado cepas probióticas productoras de D-



lactato a niños a término y prematuros han revelado que no se produce ningún signo de acidosis, incluso tras su administración diaria durante los primeros 12 meses de vida (Connolly et al. 2005, Connolly, Lönnnerdal 2003).

En este sentido, este tipo de acidosis sólo se presenta cuando coinciden los siguientes requisitos: (a) síndrome de intestino corto; (b) consumo de grandes cantidades de carbohidratos; (c) malabsorción de carbohidratos con un aumento de nutrientes en el colon; (d) sobrecrecimiento de bacterias productoras de D-lactato de la propia microbiota; (e) motilidad colónica disminuida; y (f) alteración en el metabolismo del ácido D-láctico (Uribarri et al. 1998, Hove 1998). No obstante, la administración una cepa productora de ácido D-láctico en pacientes de riesgo (cirugía intestinal, síndrome de intestino corto) debe ser cuidadosamente vigilada si está avalada de datos de seguridad con relación a este aspecto específico.

#### *II.6.2.4. Producción de aminas biógenas*

Las aminas biógenas (AB) son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que se forman principalmente por descarboxilación de aminoácidos y que ejercen funciones fisiológicas esenciales para los seres vivos. Sin embargo, la descarboxilación de algunos aminoácidos, llevada a cabo por determinados microorganismos, puede provocar la presencia de concentraciones altas de AB (histamina, tiramina...) en los alimentos. Para ello, es importante que el alimento contenga una elevada carga proteica y que se den las condiciones adecuadas para una intensa proteólisis. Estas condiciones se dan en ciertos alimentos fermentados, cuando la fermentación está dirigida por bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*) con actividad aminoacil-descarboxilasa, una propiedad que depende de la cepa y no de la especie (Pérez et al. 2016).

Cabe destacar que hay personas especialmente sensibles a las AB debido a que los enzimas responsables de su detoxificación, la monoamino oxidasa (MAO) o la diamino oxidasa (DAO) no son funcionales, bien por problemas genéticos o por la presencia de inhibidores como el alcohol o determinados fármacos antidepresivos. Por tanto, es difícil establecer los niveles tóxicos para cada una de las AB ya que depende de la eficacia de los sistemas de detoxificación y, por lo tanto, varía de unos individuos a otros. Por este motivo, la incapacidad de sintetizar AB debe estar incluida en los criterios de selección de los cultivos iniciadores y también de aquellos probióticos que se vayan a vehicular a través de alimentos donde se puedan dar las condiciones para su formación.

#### II.6.2.5. Resistencia a antibióticos

El auge de las bacterias (multi)resistentes a los antibióticos representa un serio peligro para la Salud Pública. En consecuencia, la posible presencia de genes transmisibles que puedan conferir dicho fenotipo a las bacterias de la microbiota de un hospedador (incluyendo aquellas potencialmente patógenas) es un aspecto muy relevante en la evaluación de la seguridad de las bacterias que se deseen emplear como probióticos. No obstante, hay que señalar que, hasta la fecha, no se ha publicado ningún ensayo *in vivo* que haya demostrado la transferencia de este tipo de genes entre una cepa probiótica y cualquier miembro de la microbiota autóctona humana.

La determinación de la resistencia a los antibióticos parece una prueba relativamente sencilla pero, tradicionalmente, los ensayos que implican a bifidobacterias y bacterias lácticas (excepto enterococos) se han enfrentado a dificultades de estandarización. Actualmente se considera que se debe realizar de acuerdo a procedimientos aceptados internacionalmente como, por ejemplo, la versión más actualizada de la guía del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) o la norma ISO 10932:2010 (IDF 223:2010). También se utilizan ampliamente los criterios propuestos por Klare *et al.* (2005; 2007) para este tipo de bacterias.

La resistencia a antibióticos forma parte del esquema de evaluación de seguridad propuesto por la EFSA para determinar el carácter QPS de una cepa (EFSA FEEDAP Panel 2012). Para ello, indica los antibióticos que habría que considerar dependiendo del género o especie a evaluar y, además, proporciona valores de corte. Salvo excepciones, este abordaje requiere la determinación de la concentración mínima inhibidora (CMI) frente a ampicilina, vancomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol. Cuando una cepa es resistente a un antibiótico hay que determinar el tipo de resistencia. Se habla de resistencia intrínseca cuando dicha propiedad es inherente a todas las cepas de una especie mientras que es adquirida cuando una cepa de una especie típicamente sensible a un antibiótico muestra resistencia al mismo. En este segundo caso, hay que presentar datos genéticos que expliquen la causa de la resistencia ya que puede ser debida a mutaciones en genes endógenos de la cepa o por adquisición de genes exógenos (*tetW*, *tetM*, *tetS*, *ermB*...) (Ammor *et al.* 2007, van Reenen, Dicks 2011, Devirgiliis *et al.* 2013).

En este contexto, el criterio de la EFSA (EFSA FEEDAP Panel 2012) es el siguiente: (a) el potencial de transmisión horizontal de la(s) resistencia(s) intrínseca(s) es mínimo por lo que las bacterias que la(s) porta(n) pueden ser empleadas en los alimentos; (b) el potencial de transmisión horizontal de la(s) resistencia(s) adquirida(s) debidas a mutaciones cromosómicas es bajo por lo que,

en general, las bacterias que la(s) porta(n) pueden ser empleadas en los alimentos; (c) las bacterias que portan resistencia adquirida como consecuencia de la incorporación de elementos genéticos (y, especialmente, elementos genéticos móviles: plásmidos, transposones...) son las que poseen el mayor potencial de transmisión horizontal por lo que no deben ser empleadas en los alimentos; (d) se debe evitar usar cualquier cepa en caso de que no se disponga de información genética sobre la naturaleza de una resistencia demostrada; y (e) la presencia de resistencias no convierte a un lactobacilo o una bifidobacteria en un microorganismo patógeno.

#### *II.6.2.6. Efectos negativos sobre el sistema inmunitario*

La evaluación de seguridad de los probióticos también debe contemplar su impacto en hospedadores inmunológicamente inmaduros o inmunocomprometidos. Todos los microorganismos, tanto autóctonos como alógenos (<http://www.sepyp.es/es/wiki>), ejercen un impacto sobre sistema inmunológico. La microbiota autóctona o de ocupación es crucial para el desarrollo y mantenimiento de la fisiología y homeostasis de las mucosas y epitelios que habitan, unos lugares que actúan como barrera altamente selectiva y órgano de comunicación entre el medio ambiente luminal y el anfitrión (O'Hara, Shanahan 2006). Un fracaso en esta interacción puede contribuir al desarrollo de patologías inflamatorias, metabólicas o infecciosas. En este contexto, el hecho de que, en muchos casos, los mecanismos por los que los probióticos ejercen su acción todavía no sean bien conocidos, es un inconveniente para poder predecir la seguridad inmunológica de una intervención probiótica.

El que un probiótico ejerza efectos inmunoestimulantes o inmunosupresores, que según las circunstancias pueden ser protectores o nocivos, depende de las interacciones entre las señales microbianas, la base genética del hospedador y las condiciones ambientales. Diversos estudios han mostrado que ciertas bacterias probióticas estimulan la proliferación y actividad de las células inmunitarias, aumentando la eficacia de la respuesta frente a patógenos. En contraste, otros probióticos son eficaces frente a las inflamaciones crónicas y las alergias mediante la supresión de células efectoras y la inducción de mecanismos de tolerancia (Kalliomaki et al. 2003, Kruis et al. 2004). El conocimiento de las relaciones entre la estructura (genotipo, fenotipo) y las funciones de los probióticos en las poblaciones diana limitará el riesgo de inducir efectos inmunológicos adversos en un hospedador.

#### *II.6.3. Seguridad de los excipientes*

La evaluación de seguridad de un probiótico debe tener en cuenta los excipientes empleados en la formulación de los productos finales. Por ejemplo, se han descrito casos de niños que han sufrido reacciones anafilácticas debidas

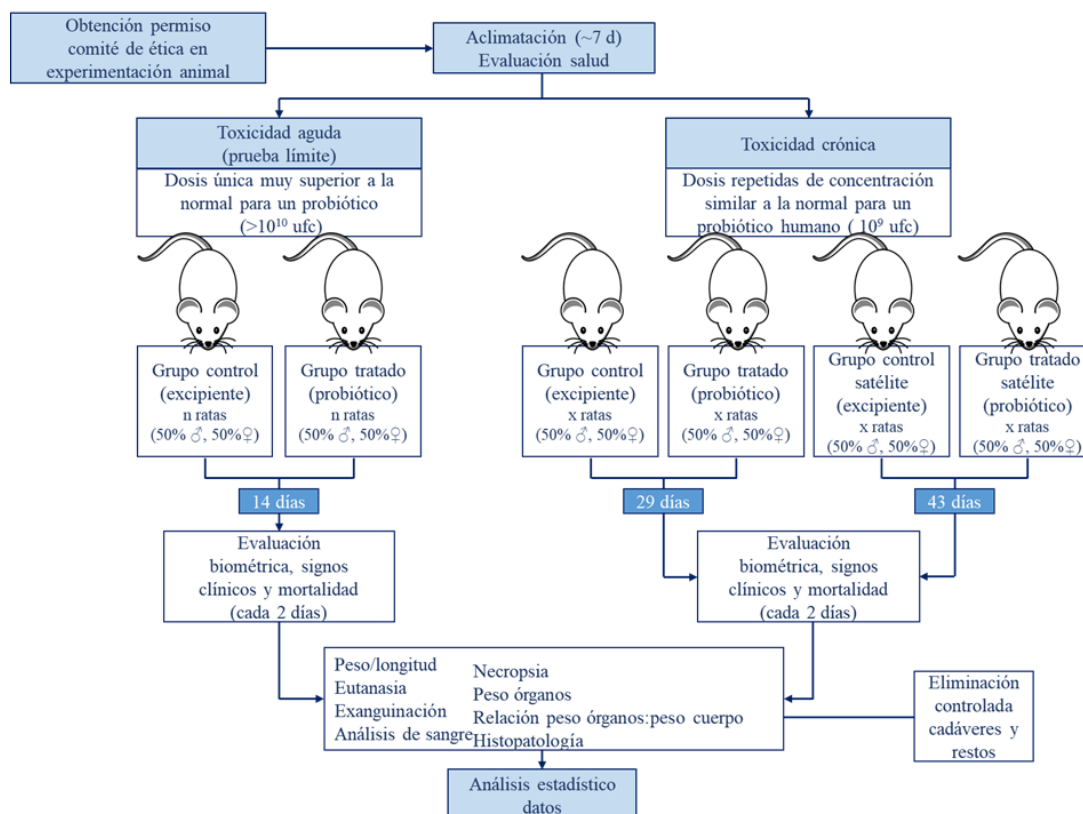
a la exposición a las proteínas de leche de vaca empleada como excipiente (Moneret-Vautrin et al. 2006, Lee et al. 2007). En este sentido, los productos probióticos deben respetar la normativa vigente relativa a la declaración de alérgenos en el etiquetado (Real Decreto 2220/2004 2004, Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo 2011). Por lo que respecta a los ensayos clínicos, es importante incluir la alergia o intolerancia al excipiente entre los criterios de exclusión.

#### II.6.4. Modelos de evaluación de la seguridad

Existen numerosos tipos de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para evaluar la seguridad de los probióticos. En general, todos son útiles para tener más información a la hora de seleccionar las cepas más seguras aunque los que se basan en pruebas fenotípicas sencillas y en el empleo de cultivos celulares poseen, en mayor o menor medida, el inconveniente de no reflejar adecuadamente las complejas interacciones que se establecen en un ser vivo. Las pruebas en animales han sido consideradas tradicionalmente como una parte esencial en la evaluación de la seguridad de cualquier cosa que se pretenda administrar a humanos. Para ello, se han empleado una amplia gama de especies pertenecientes a diversas clases zoológicas destacando, entre todas ellas, el modelo de rata. No obstante, los modelos animales también son objeto de controversia por las connotaciones éticas inherentes y porque frecuentemente los datos de seguridad obtenidos no son directamente extrapolables a la especie humana (Sanders et al. 2010). Por ello, es deseable que el modelo animal sea seleccionado por su capacidad para predecir lo que pueda suceder en una persona, lo que implica que su anatomía y fisiología, incluyendo su desarrollo, los procesos metabólicos, las respuestas del sistema inmunitario y la composición del microbioma, sean lo más similares posibles a las nuestras. En este sentido, el cerdo es el modelo ideal *a pesar de que plantea problemas de coste y espacio que frecuentemente obligan a optar por otras especies*.

Hasta la fecha, los estudios de toxicidad oral aguda, subcrónica y crónica de probióticos en modelos estándar (por ejemplo, ratas sanas) (**Fig. 18**) no han mostrado efectos adversos incluso cuando se han administrado a grandes dosis (hasta 10.000 veces mayores que las consumidas normalmente en humanos) durante un periodo de tiempo prolongado. Debido a esta baja o nula patogenicidad, algunos autores han recurrido al empleo de animales inmunodeprimidos o genéticamente predispuestos a padecer ciertas patologías para evaluar la seguridad de los probióticos aunque esta estrategia también ha sido cuestionada por la dificultad de extrapolar los resultados a una situación real. Otra alternativa a la que se ha recurrido para tratar de forzar la patogenicidad de los probióticos es su administración por rutas inusuales (intravenosa, intraperitoneal...). Nuevamente, son abordajes que no se pueden validar ya que *los resultados obtenidos* no son, en absoluto, extrapolables a lo que sucede cuando la misma cepa se administra por vía oral.

Globalmente, aunque las distintas pruebas *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales pueden proporcionar información útil durante el proceso de selección de cepas, los únicos datos que permiten evaluar la seguridad de un probiótico de una forma directa son los que se obtienen en el curso de ensayos clínicos de fase 1 y fase 2, correctamente diseñados y dirigidos específicamente a la población diana.



**Figura 18. Diseño típico de los estudios de toxicidad oral en ratas.** Modificado de Rodríguez 2015.

## II.6.5. Funcionalidad

De forma similar a la evaluación de la seguridad, también existen numerosos ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para detectar aquellas cepas que poseen propiedades funcionales relevantes. En mayor o menor medida, todos son útiles para disponer de la mayor información posible a la hora de hacer un escrutinio para seleccionar las cepas con mayor potencial probiótico pero, en la práctica, la mayor parte de los ensayos *in vitro* y *ex vivo* no permiten garantizar la funcionalidad de los microorganismos probióticos en un hospedador. Nuevamente, serán los ensayos clínicos (fase 2 y 3) los que determinen si un probiótico ejerce el efecto beneficioso que se esperaba sobre la población diana.

Desde el punto de vista funcional, los criterios de selección suelen incluir, por una parte, una serie de prerrequisitos para que la cepa pueda alcanzar

su lugar de acción en una concentración adecuada (habitante normal del hospedador diana, resistencia al tránsito por el aparato digestivo, capacidad de adhesión a las células epiteliales...) y, por otra, propiedades que pudieran asociarse a un efecto beneficioso en un hospedador (producción de sustancias antimicrobianas, exclusión competitiva de patógenos, estimulación de la síntesis de mucinas, producción de ácidos grasos de cadena corta, síntesis de compuestos bioactivos determinados, neutralización o detoxificación de carcinógenos y de contaminantes abióticos, inmunomodulación, endocrinomodulación, neuromodulación...) (**Fig. 19**).

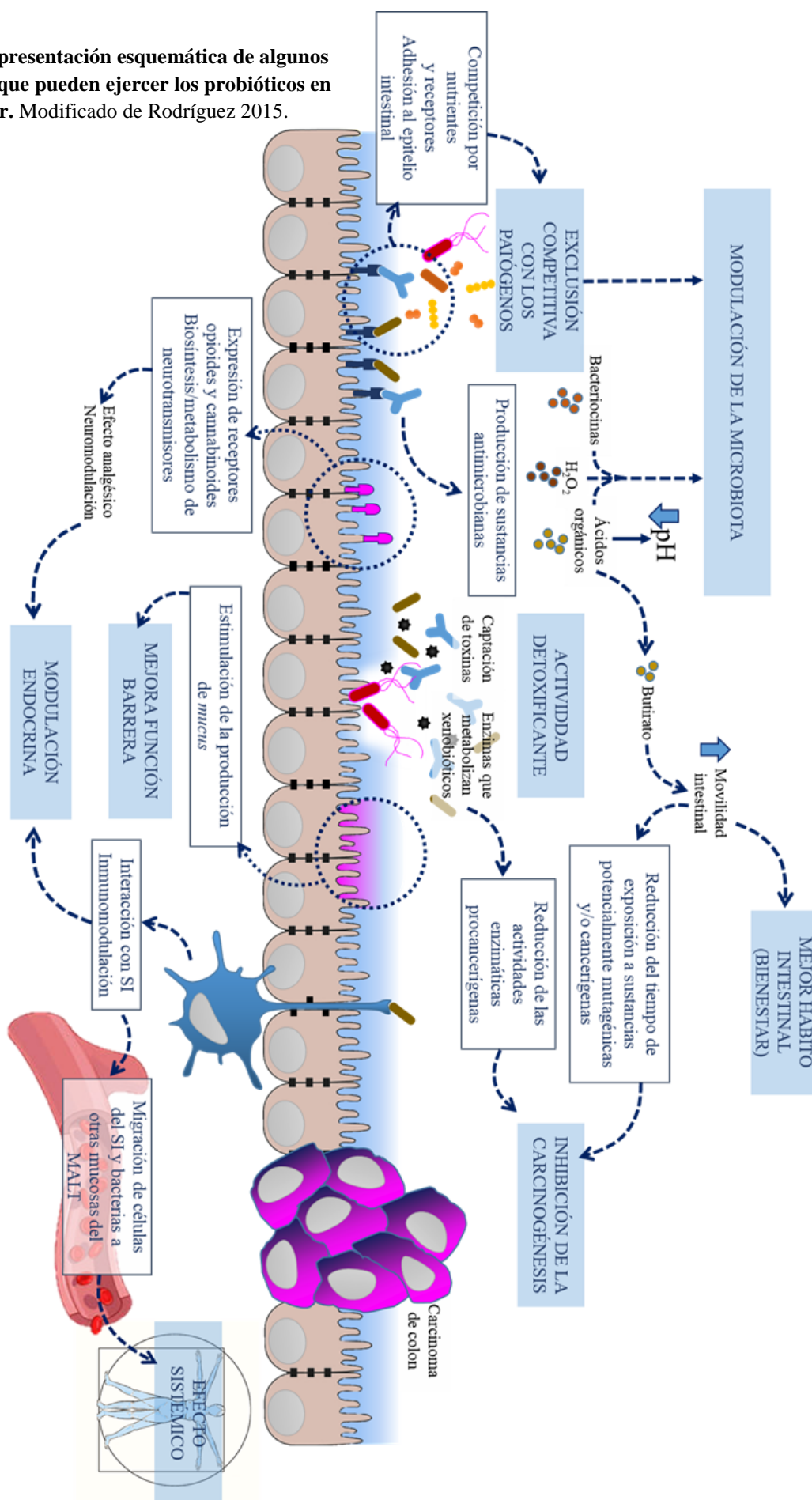
#### *II.6.5.1. Prerrequisitos*

Tradicionalmente se recomendaba que las cepas probióticas se hubieran aislado de muestras de la misma especie a la que se le iban a administrar, basándose en la creencia de que las cepas de origen humano se implantarían o colonizarían el epitelio gastrointestinal humano con mayor facilidad que las aisladas de otras especies (Holzapfel et al. 1998, Ouwehand et al. 1999, Shortt 1999). Sin embargo, el informe del grupo de trabajo FAO/OMS citado anteriormente concluyó que no existe un criterio definido para el término “origen humano” (FAO/WHO 2002) ya que, en muchos casos, resulta extraordinariamente difícil, sino imposible, conocer el origen de una cepa (humano, animal, vegetal, alimentario...) a pesar de que haya sido aislada, por ejemplo, de una muestra de heces humanas. Igualmente señaló que existen diversos ejemplos de cepas probióticas que pertenecen a especies autóctonas pero con efectos beneficiosos documentados en humanos. Por todo ello, concluyó que, globalmente, la propiedad “*origen humano*” no constituye un criterio relevante en la selección de probióticos para su uso en nuestra especie.

Para que las cepas probióticas que se administran oralmente puedan ejercer sus efectos beneficiosos deben ser capaces de resistir las condiciones ambientales existentes durante el tránsito por el aparato digestivo (saliva, acidez gástrica, bilis, secreción pancreática...), teniendo en cuenta que la composición de las distintas secreciones, el tiempo de vaciado gástrico o la motilidad intestinal pueden variar dependiendo de la edad y del estado de salud del hospedador. Para determinar la resistencia, se puede recurrir a métodos *in vitro* como la acidificación y/o la adición de sales biliares al medio de cultivo, al empleo de secreciones gastrointestinales obtenidas de individuos sanos o al uso de modelos dinámicos más sofisticados como los desarrollados por el *Netherlands Organisation for Applied Scientific Research* en Holanda (TNO) (Marteau et al. 1997). La supervivencia de los probióticos durante su tránsito también se puede estudiar *in vivo* usando técnicas de intubación intestinal y biopsias del colon o analizando su presencia en las heces de personas o animales que los hayan ingerido, recurriendo a técnicas moleculares que permitan discriminarlas entre los miembros de la microbiota autóctona del anfitrión.



**Figura 19. Representación esquemática de algunos de los efectos que pueden ejercer los probióticos en un hospedador.** Modificado de Rodríguez 2015.



Un factor importante para la supervivencia de bacterias probióticas es el substrato o matriz con el que se vehiculan y, de hecho, los resultados obtenidos en medios de cultivo no son extrapolables a lo que sucede cuando las cepas se vehiculan mediante alimentos o encapsuladas (Saxelin et al. 1993, Saxelin et al. 1995, Charteris et al. 1998). Desde hace varios años se trabaja activamente en sistemas que permitan la máxima protección de las cepas probióticas durante su paso por el estómago y el duodeno, de tal manera que este criterio no suponga una limitación real.

Obviamente, lo mismo es aplicable para la administración de probióticos por otras vías clásicas (vaginal) o emergentes (colirio oftalmológico, solución ótica, aplicación sobre la piel...) siempre teniendo en cuenta las condiciones específicas de cada ecosistema.

#### *II.6.5.2. Propiedades funcionales propiamente dichas*

Las propiedades funcionales por las que se seleccione un probiótico pueden ser tan amplias como nos permita nuestra imaginación, la tecnología y el presupuesto disponible. Por este motivo, la intención de este apartado no es la de ofrecer un catálogo completo de características potencialmente probióticas sino destacar la diversidad y complejidad de las alternativas existentes.

Como se ha comentado anteriormente, la adhesión a las células epiteliales es una propiedad controvertida. Sin embargo, para muchos autores sigue siendo una característica clave para que una cepa colonice una mucosa y ejerza un efecto probiótico, que puede ir desde la exclusión competitiva de patógenos (al competir por los mismos receptores) hasta complejas interacciones neuroinmunológicas, pasando por la inducción de la biosíntesis de péptidos antimicrobianos o de mucinas por parte de las células epiteliales. En el proceso de adhesión están implicadas diversas proteínas de superficie, incluyendo proteínas de unión al *mucus*, y algunas estructuras específicas, como los *pili* descritos en algunas cepas de *Lactobacillus rhamnosus*. Los fenómenos de auto-agregación pueden aumentar sustancialmente la capacidad de colonización en aquellos ecosistemas en los que los probióticos tienen un tiempo de residencia corto.

Otra propiedad relevante de algunas cepas probióticas es la de coagregar con ciertos patógenos y, en consecuencia, impedir su acceso a las mucosas. El impacto antimicrobiano de la coagregación es particularmente relevante cuando la misma cepa es capaz de producir sustancias antimicrobianas (ácido orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, reuterina...) que inhiban al patógeno en cuestión (Boris et al. 1998).

La integridad de las mucosas está influenciada por muchos factores, incluyendo los cambios en la permeabilidad, la composición de las mucinas, el



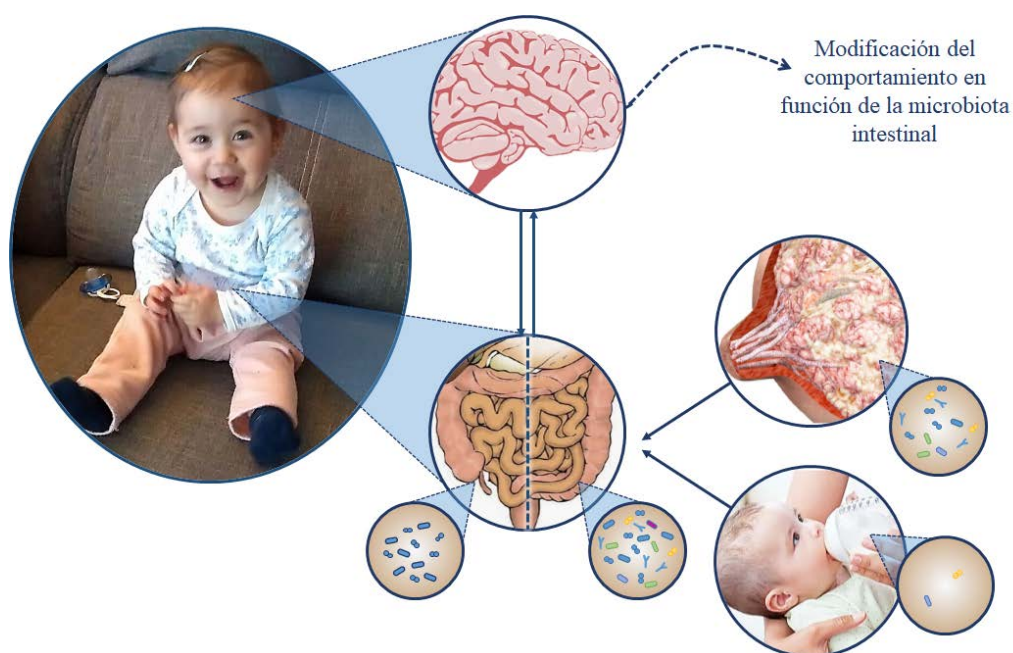
estrés oxidativo o la relación entre la producción de nuevas células epiteliales y la tasa de apoptosis de las células epiteliales dañadas o envejecidas. Diversos estudios han demostrado la capacidad de algunos probióticos para mantener o mejorar la función de barrera intestinal mediante la modificación de la expresión de las proteínas que forman parte de las zonas de oclusión (occludina, ZO-1, claudina-1, claudina-4, JAM-A...), la modificación de la composición de monosacáridos de las mucinas y el aumento del grosor de la capa de mucus, la inhibición de los procesos de apoptosis y/o la promoción de la diferenciación celular y de actividades citoprotectoras, incluyendo la reducción del estrés oxidativo (Howarth, Wang 2013).

El tejido linfoide asociado a las mucosas (MALT) representa la parte mayoritaria del sistema inmunitario y su interacción con la microbiota constituye uno de los pilares de la salud. De hecho, los procesos de disbiosis de la microbiota endógena alteran la respuesta inmunitaria y contribuyen a la aparición de enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunes (Howarth, Wang 2013). Por ello, no es de extrañar que la capacidad de inmunomodulación sea una de las actividades que más se hayan asociado a los probióticos. En este sentido, se ha evaluado el efecto de diversas cepas sobre los distintos componentes tanto de la inmunidad innata (células NK, células dendríticas, macrófagos, células epiteliales...) como de la adaptativa o adquirida (células *T helper* (Th) 1, Th2, Th17, T<sub>reg</sub>, T citotóxicos y B), incluyendo la proliferación y expresión génica de diversas poblaciones de células del sistema inmunitario y la producción de un amplio espectro de inmunoglobulinas, citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento por parte de las mismas (Hardy et al. 2013). No obstante, el proceso de selección tiene que tener en cuenta que el tipo de respuesta inmunológica asociada a un probiótico (inmunoactivación, inmunodesviación, inmunoregulación, inmunosupresión) puede ser positiva o negativa dependiendo del estado del hospedador. En consecuencia, para modular una inmunopatía en beneficio del hospedador se debe tener el mayor conocimiento posible sobre los mecanismos responsables de la patología y sobre las respuestas que se pueden esperar del probiótico. Por ello, la cepa debe ser cuidadosamente seleccionada dependiendo de la población a la que esté dirigida.

La neuromodulación es uno de los efectos más prometedores en el campo de los probióticos (**Fig. 20**). El tracto gastrointestinal humano contiene una red nerviosa muy compleja, denominada Sistema Nervioso Entérico (SNE), cuyo objetivo principal es la regulación de las funciones fisiológicas y la modulación de la comunicación entre el intestino y el sistema nervioso central, tanto en sentido ascendente (intestino-cerebro) como descendente (cerebro-intestino) (Mayer 2011). Este sistema de comunicación se conoce como el “eje intestino-cerebro” y sirve de coordinación entre el cerebro, el tracto gastrointestinal, el sistema endocrinológico y el sistema inmunitario. Las alteraciones en el “eje intestino-cerebro” suelen estar asociadas a ciertas patologías psiquiátricas (desde

la ansiedad y la depresión hasta el autismo) e intestinales (síndrome de intestino irritable) y a la presencia de una microbiota aberrante en los individuos que las padecen (Critchfield et al. 2011, Saulnier et al. 2013). En este sentido, se considera que los probióticos pueden tener un impacto importante para estas poblaciones aunque, nuevamente, será necesaria una cuidadosa selección de las cepas (efectos en la biosíntesis y metabolismo de neurotransmisores...) y estudios que revelen la magnitud, mecanismos y relevancia clínica de los posibles efectos beneficiosos.

Existe un amplio y creciente espectro de pruebas fenotípicas para poner de manifiesto propiedades probióticas mediante procedimientos *in vitro*. Además, la disponibilidad de un análisis funcional del genoma empleando las tecnologías de secuenciación de nueva generación y las nuevas micromatrices funcionales han revolucionado el descubrimiento de propiedades potencialmente probióticas dentro de una cepa (Saulnier et al. 2011, Douillard, de Vos 2014, Tu et al. 2014). Este abordaje permite un detallado análisis de genes implicados en la colonización, persistencia, interacción y señalización dentro del hospedador humano y, en consecuencia, una selección rápida de cepas con propiedades muy específicas.



**Figura 20. Eje intestino-SNC.** Las bacterias adquiridas en los primeros meses de vida pueden influenciar el comportamiento del recién nacido actuando sobre el SNC.

Los ensayos *in vivo* ofrecen la ventaja de poder aplicar una amplia gama de técnicas (desde las -ómicas hasta las avanzadas de imagen, pasando por las técnicas bioquímicas, de microbiología molecular y de biología celular) para intentar dilucidar los mecanismos de acción e identificar marcadores relacionados con los efectos beneficiosos (y, eventualmente, con los posibles efectos adversos) de un probiótico.

El empleo de modelos animales permite estudiar muestras, tejidos y órganos a los que, por motivos éticos, es imposible acceder en ensayos clínicos humanos, por lo que siguen siendo imprescindibles para determinar mecanismos de acción y marcadores biomédicos. Como ya se indicó al hablar de los aspectos de seguridad de los probióticos, existen múltiples modelos que se pueden utilizar para poner de manifiesto la funcionalidad de los probióticos *in vivo*, aunque las diferencias anatómicas y fisiológicas con nuestra especie hace que sean los ensayos clínicos con personas los que finalmente determinen el grado de eficacia del probiótico para la diana elegida. Los estudios descriptivos en los que se comparan muestras de individuos sanos y enfermos son extremadamente útiles para determinar los marcadores que hay que incluir en los ensayos clínicos, cuyo objetivo debe ser determinar si realmente se produce el “efecto beneficioso” incluido en la definición de probiótico y, en ese caso, cuál es su magnitud.

Los ensayos clínicos en los que se evalúa la eficacia son, típicamente, los de fase 2 y 3. Los estudios de fase 2 evalúan la eficacia de un probiótico frente a un placebo, preferentemente en formato de doble ciego, y recogen los posibles efectos adversos. El resultado deseable sería una mejora biológica y estadísticamente significativa en alguno(s) de los siguientes aspectos: bienestar o calidad de vida, reducción del riesgo de enfermedad, recuperación más rápida, menor sintomatología y/o aumento del tiempo entre recurrencias. Se necesitan más evidencias clínicas derivadas de este tipo de estudios para que los probióticos (especie, cepa, formulación, dosis, aplicación específica para la que ha mostrado eficacia) ganen credibilidad entre los consumidores y, especialmente, entre la comunidad sanitaria, independientemente de que se comercialicen en forma de alimentos o presentaciones medicamentosas.

Los estudios de fase 3 evalúan la eficacia de un probiótico frente a la terapia estándar empleada para prevenir o tratar una enfermedad determinada (Arroyo et al. 2010). En general, son ensayos ciegos y aleatorizados en los que el tamaño de la muestra debe ser calculado cuidadosamente y en los que se deben incluir los posibles efectos adversos e incidencias, una evaluación de la relación riesgo/beneficio y una serie de controles para comprobar la calidad del ensayo. El problema de los estudios de fase 3 es que son muy caros, por lo que tienden a restringirse a aquellos casos en los que parece más evidente que puedan reemplazar o complementar a los medicamentos convencionales. Un ejemplo claro de ello es el tratamiento de las enfermedades infecciosas, debido a la incidencia creciente de la resistencia a antibióticos entre los microorganismos patógenos.

#### II.6.6. Aspectos tecnológicos

El hecho de que una cepa bacteriana crezca bien en condiciones de laboratorio (pequeños volúmenes, medios de cultivo complejos...) no significa, ni mucho menos, que vaya a suceder lo mismo en condiciones industriales. En

este sentido, las empresas que comercializan o desean comercializar probióticos se enfrentan a dos retos tecnológicos importantes: (1) la necesidad de obtener una biomasa bacteriana muy elevada de forma económicamente rentable y (2) la necesidad de que la concentración de bacterias viables necesaria para ejercer el efecto beneficioso se mantenga hasta el final de la vida útil del producto.

Ambos aspectos están relacionados con las características fisiológicas de cada cepa, por lo que las condiciones deben establecerse caso a caso. Además, la viabilidad también depende del formato en el que se vayan a administrar las bacterias ya que, por ejemplo, la vida útil de los productos lácteos probióticos refrigerados es notablemente más corta que la de los productos liofilizados que se venden con una presentación medicamentosa (cápsula, polvo...). A su vez, dentro de los productos liofilizados existen diversos parámetros (concentración de oxígeno, humedad, temperatura de almacenamiento...) y formatos (microencapsulación, recubrimientos...) que juegan un papel importante en la estabilidad del producto. En cualquier caso, resulta inevitable que una cierta proporción de bacterias mueran o resulten dañadas durante el proceso productivo o el almacenamiento del preparado probiótico y, en este sentido, las empresas suelen recurrir a la sobredosificación inicial, de tal manera que se conserve la dosis eficaz hasta el final de su vida útil.

Las empresas que se dedican al desarrollo de probióticos (incluyendo el escalado industrial y los estudios de viabilidad) suelen organizar su trabajo en forma de etapas con un grado creciente de dificultad en las que es absolutamente necesario que se alcancen los objetivos de una fase para poder pasar a la siguiente. La primera etapa suele consistir en: (a) el depósito de la cepa en el banco de la empresa y la comprobación de su identidad (especie) y (b) la evaluación de su capacidad fermentativa (producción, limosidad, morfología...) a pequeña escala en biorreactores o mini-fermentadores que simulen las condiciones de los fermentadores de producción (temperatura, pH, agitación...).

La segunda fase consiste en el escalado a producciones en planta piloto para evaluar la productividad antes y después del proceso de liofilización y el estudio de la estabilidad a los tres meses. En general, el objetivo es que el microorganismo permanezca viable (pérdida  $\leq 10^2$  ufc/g) en una mezcla con celulosa (u otro excipiente) envasada en sobres de papel de aluminio, almacenados a una actividad de agua constante ( $< 0,2$ ) y a  $25^{\circ}\text{C}$ . En la siguiente fase, se determina el flujo de trabajo para que el probiótico entre en la fase de fabricación. Tras la primera producción, se define el precio sobre la base del perfil del producto (ufc/g) y se completa la validación analítica de la mezcla. El objetivo final es la liberación del producto mientras se continúan los estudios de estabilidad a largo plazo (dos años), tanto en refrigeración como a temperatura ambiente ( $\sim 25^{\circ}\text{C}$ ). En general, se pretende que el procedimiento permita disponer de un producto con una elevada concentración ( $> 5 \times 10^{10}$  ufc/g) que, una vez dosificado en los envases finales, tenga una vida útil prolongada a

temperatura ambiente. En los casos en los que no es posible, el producto se tiene que conservar en refrigeración hasta su venta.

En cualquier caso, resulta imprescindible la aplicación de los principios del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) y de buenas prácticas de fabricación para garantizar que los preparados probióticos llegan al consumidor con la máxima calidad posible; por ejemplo, es importante descartar la contaminación por otros microorganismos y el mantenimiento de la viabilidad de las cepas y la estabilidad de los excipientes hasta, al menos, el final del periodo de vida útil del preparado. Es recomendable, asimismo, que las empresas que comercializan probióticos hagan controles de los productos de la competencia en el marco de la protección de cepas patentadas y de los derechos de propiedad industrial.

Cuando una empresa introduce un probiótico en el mercado, debería asegurar que está bien etiquetado. En este sentido, el comité de expertos de la FAO/WHO (Expert Consultation on Evaluation of Health FAO/WHO 2001, FAO/WHO 2002) recomendó que se recoja la siguiente información en la etiqueta de cualquier producto que contenga probióticos: a) género, especie y cepa; b) dosis mínima de microorganismos viables al final de la vida útil; c) cantidad necesaria de producto que se debe consumir para conseguir la dosis efectiva; d) efecto(s) beneficioso(s); e) condiciones de almacenamiento y f) forma de contacto con el servicio de atención al cliente.

Finalmente, es de esperar que el cúmulo de evidencias científicas obtenidas desde la primera evaluación por EFSA de las alegaciones de salud de productos probióticos, unida a una presentación adecuada de las mismas, permita la admisión de los preparados que los contienen y que cumplen con las exigencias publicadas en su día (EFSA on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) 2011).

### II.6.7. Aspectos comerciales

La opinión del departamento comercial de una empresa alimentaria o farmacéutica resulta fundamental a la hora de tomar una decisión sobre el desarrollo industrial y la eventual puesta en el mercado de un probiótico. Las funciones de dicho departamento incluyen, entre otras, los estudios de mercado (que permiten detectar aquellas necesidades de los consumidores, cuya resolución pueda ser rentable), la promoción y publicidad del producto, las ventas y el servicio post-venta. Normalmente, son actividades que implican una interacción constante con los departamentos de producción, financiero y de recursos humanos.

En general, se suelen identificar tres figuras con relación a la decisión de compra: el *prescriptor* (profesional que recomienda el producto y cuya opinión es valorada por el consumidor; por ejemplo, el médico, el veterinario o el

farmacéutico), el *comprador* (persona que adquiere el producto pero que no tiene por qué coincidir con el consumidor; por ejemplo, los padres que compran un preparado probiótico indicado para cólico del lactante) y *el consumidor*. Por otra parte, resulta importante tener en cuenta la segmentación de mercado, bien por género (por ejemplo, los probióticos para infecciones vaginales o para mastitis), edad (probióticos pediátricos o para la tercera edad), nivel de ingresos, etc.

Las campañas de marketing básicamente se suelen enfocar, como en cualquier otro tipo de producto, en distintos elementos: sus características (incluyendo el envase), el precio, la distribución o disponibilidad y el servicio post-venta. Normalmente, el ciclo de vida de un producto comprende las etapas de *introducción o lanzamiento* (salida al mercado de un nuevo preparado; se producen ventas pero el saldo puede llegar a ser negativo ya que implica un gasto de promoción notable), *crecimiento* (el producto empieza a ser conocido, las ventas experimentan un fuerte desarrollo y los beneficios también) y *madurez* (las ventas se estabilizan y los beneficios hacen lo propio). Eventualmente, puede existir una etapa de *declive* o *saturación* (caída considerable de ventas y beneficios), durante la que se puede intentar relanzar el producto introduciendo alguna innovación.

La determinación del precio se puede basar en los costes, en la elasticidad de la demanda, en los precios que fija la competencia para productos similares, etc. En general, los preparados probióticos disponibles en farmacias y parafarmacias no están cubiertos por el Sistema Público de Salud por lo que suelen tener un coste final elevado para el comprador (~1 €/cápsula, sobre u óvulo). Este hecho propicia que un porcentaje relativamente elevado de usuarios potenciales no tenga acceso a ellos, especialmente cuando se requiere un tratamiento prolongado. En el futuro, la mayor disponibilidad de resultados basados en ensayos clínicos bien diseñados y ciertos cambios normativos podrían hacer variar la situación.

La política de distribución permite que el producto se encuentre en el lugar y momento adecuados para poder ser adquirido por el consumidor. En general, el proceso que sigue el producto desde que sale de la cadena de producción hasta que llega a manos del cliente es el siguiente: almacenamiento del producto, distribución física, facturación y cobro. El canal de distribución es cualquiera de los medios (establecimientos alimentarios, farmacias, parafarmacias...) que se utilizan para conseguir que los productos recorran el camino desde el productor hasta el consumidor.

La promoción del producto incluye la publicidad en diversos medios, especialmente en revistas especializadas y en el lugar de venta y la visita a los la visita a los profesionales sanitarios por parte de representantes de la empresa. En este sentido, es también importante la

promoción de la interacción entre los investigadores y clínicos que aislaron y evaluaron la(s) cepa(s) probiótica(s) y los prescriptores, a través de reuniones o sesiones en congresos. Esto les facilitará una información de primera mano sobre las bondades del preparado, que probablemente se percibirá como menos sesgada que la ofrecida por los representantes de la compañía comercializadora. Por último, existe la posibilidad de la divulgación para el público en general, aunque en este caso parece más apropiado suministrar información sobre la microbiota de ocupación, sus funciones y los beneficios que aporta, de modo que el uso de probióticos se perciba como lo que es, una aplicación racional de dichos beneficios en aras de una mejor Salud Pública.

## II.7. MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL

---

El interés por la microbiota humana y su relación con la salud ha aumentado notablemente en los últimos años. El término *microbiota* se define como el conjunto de microorganismos que pueblan un hábitat y que, en este caso, conviven e interactúan con un hospedador. Cada persona adulta alberga aproximadamente  $10^{14}$  células microbianas que, pese a su pequeño tamaño, representa en torno al 2% de nuestra masa corporal, equiparándose en tamaño a órganos vitales como el hígado o cerebro (Warinner et al. 2015).

Cada una de nuestras células humanas contiene un genoma (~3 Giga-bases) que consta de 23.000 genes mientras que la microbiota aporta entre 2 y 20 millones de genes (~500 Giga-bases), constituyendo por tanto entre el 99 y el 99,9% de los genes existentes en nuestro cuerpo. El conjunto de genes de todos los microorganismos de la microbiota humana se denomina *microbioma* humano. Los seres humanos somos prácticamente idénticos en nuestra composición genética y, sin embargo, pequeñas diferencias en nuestro ADN dan lugar a una extraordinaria diversidad fenotípica entre la población humana. Por el contrario, el microbioma humano es bastante más variable, de tal manera que únicamente un tercio de sus genes constitutivos se pueden detectar en la mayoría de individuos sanos (Lloyd-Price et al. 2017). Entender esta variabilidad en el "microbioma sano" es un desafío científico de primera magnitud que todavía dista mucho de estar aclarado. En cualquier caso, el microbioma contribuye de una forma muy relevante a la diversidad genómica humana por lo que, en otras palabras, sería más apropiado vernos a nosotros mismos como un conjunto de muchas especies, en el que nuestro bagaje genético está integrado tanto por los genes humanos como por los genomas de nuestros socios microbianos. El conjunto del genoma humano y del genoma de los distintos microorganismos que nos habitan constituye el *metagenoma* humano. En consecuencia, los humanos somos superorganismos cuyo metabolismo representa una amalgama de propiedades microbianas y humanas (Schele et al. 2016, Miller 2016, Scholtens et al. 2012, Sharon, Banfield 2013).

Por otra parte, cada una de las mucosas y superficies epiteliales existentes en los diferentes aparatos y sistemas constituyen microambientes específicos, cuyas características determinan la composición cualitativa y cuantitativa de las poblaciones microbianas que allí habitan en condiciones fisiológicas. La alteración de estas condiciones puede originar situaciones de disbiosis que, si son intensas y/o se prolongan en el tiempo, pueden dar lugar a la aparición de diversas patologías o enfermedades. En los últimos años, los avances en tecnologías clásicas, junto con el desarrollo de otras nuevas y su aplicación conjunta, ha facilitado el estudio de la microbiota y del microbioma humano, a



pesar de que todavía existen muchos aspectos eminentemente desconocidos en la actualidad.

### II.7.1. Diversidad de la microbiota gastrointestinal

La composición del microbioma humano es el resultado de miles de años de evolución y presión selectiva hasta alcanzar un estado de equilibrio que resulta beneficioso tanto para el hospedador como para los microorganismos que alberga (Ley et al. 2006). El término *diversidad* hace referencia tanto al número de especies de un ecosistema como a su abundancia relativa. La diversidad de las poblaciones microbianas existentes en el tracto gastrointestinal (TGI) humano es una de las más amplias del organismo aunque varía notablemente a lo largo del mismo, siendo máxima en el colon (Lloyd-Price et al. 2017). El TGI está sometido a la acción de diversas secreciones que llevan a cabo la degradación de los alimentos para que los principios inmediatos puedan ser absorbidos, obteniendo así la energía y las materias primas necesarias para la formación y reparación de los tejidos corporales y, en consecuencia, para el crecimiento. Los componentes de la dieta, junto con la composición de las distintas secreciones y otros factores, como el peristaltismo o los cambios de pH, determinan la colonización de las distintas partes del TGI.

Entre los más de 50 filos bacterianos descritos hasta la fecha, tan sólo 4 (Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes) son abundantes en la microbiota humana mientras que los restantes 9 filos que se pueden encontrar en nuestra especie tienen una representación mucho más escasa (Dethlefsen et al. 2007, El Aidy et al. 2015b). Al nivel de filo, los cambios que tienen lugar a lo largo del aparato digestivo se caracterizan por la disminución progresiva de Firmicutes desde la cavidad oral, donde es predominante (~75%), hasta el estómago y el intestino donde representa porcentajes de ~50 y 52%, respectivamente. En contraste, la presencia de Bacteroidetes tiende a aumentar desde la boca (~25%) al intestino (~45%) aunque alcanza concentraciones mínimas en el estómago (~20%) (Dethlefsen et al. 2007). A continuación, se describirá con mayor detalle los niveles taxonómicos inferiores presentes en el intestino humano.

El intestino, y especialmente el colon, es la parte del cuerpo humano que ha atraído un mayor número de estudios relacionados con la microbiota. El intestino, con sus, aproximadamente, 7,5 metros de longitud y 300 m<sup>2</sup> de superficie, constituye la principal superficie de intercambio y comunicación con el exterior. Además, su compleja interacción con los sistemas nervioso, endocrino e inmunitario, resulta fundamental para la homeostasis. En el intestino delgado, la colonización bacteriana está condicionada por un tránsito rápido y la presencia de ácido gástrico, bilis y secreción pancreática pero, aun así, se alcanzan densidades que oscilan entre los 10<sup>4</sup> ufc/g del yeyuno y los 10<sup>7</sup> ufc/g del final del íleon (Guarner 2003). Entre los microorganismos presentes en esta

parte del TGI destacan diversas especies de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* así como algunas bacterias anaerobias estrictas ácidotolerantes (Mackie et al. 1999).

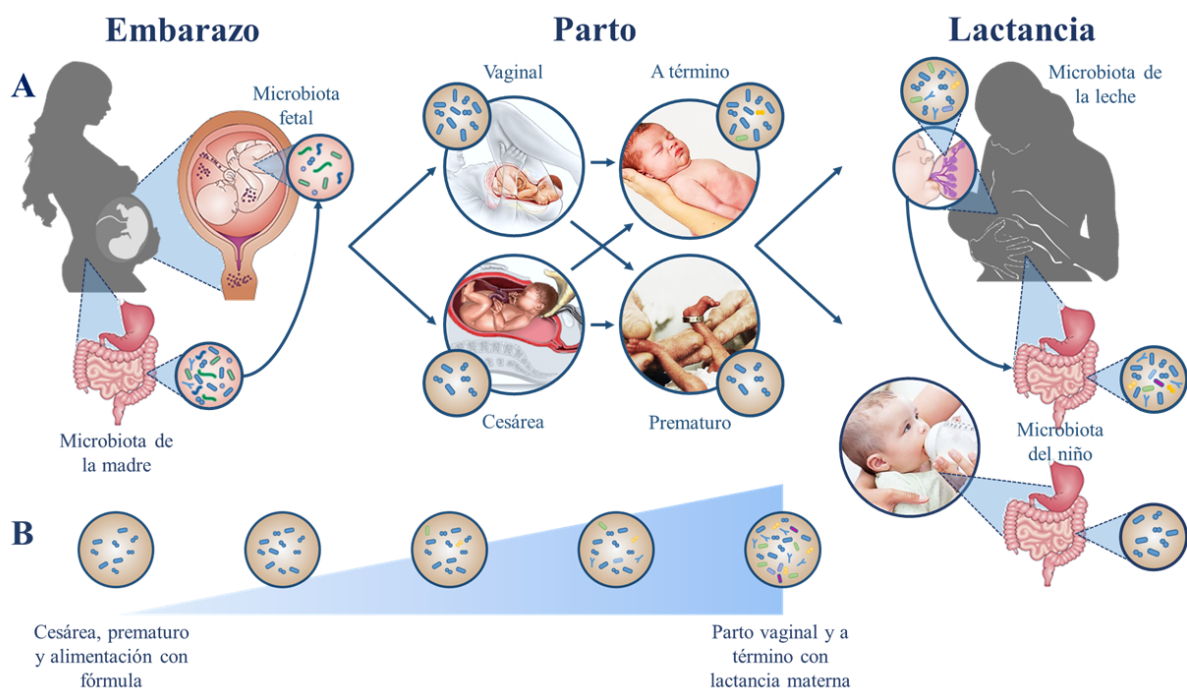
El ecosistema del colon ha sido el hábitat corporal más intensamente estudiado, ya que cuenta con una notable diversidad entre individuos y una biomasa microbiana que supera a la de otras partes del cuerpo en varias órdenes de magnitud (Sender et al. 2016). El intestino grueso es el más densamente poblado, alcanzando concentraciones microbianas de  $10^{11}$ - $10^{12}$  ufc/g. El tránsito se ralentiza, favoreciendo la actividad de las poblaciones microbianas residentes, que son capaces de metabolizar restos de alimentos no digeribles en otras zonas del aparato digestivo. El estudio de la microbiota colónica se ha centrado en el análisis de las poblaciones presentes en heces, por ser una muestra cuya obtención es sencilla y no requiere el empleo de medios invasivos. Sin embargo, el estudio de la microbiota adherida a la mucosa intestinal ha revelado importantes diferencias con la que está presente en las heces (Zoetendal et al. 2002). Por otra parte, la mayor parte de los estudios se han centrado en las bacterias (y en ellas se centrará esta sección); sin embargo, otros miembros del microbioma (virus, arqueas, mohos, levaduras y ciertos eucariotas, incluyendo todos los protozoos) pueden jugar papeles tan importantes como desconocidos en la estabilidad y funciones del microbioma intestinal, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Huffnagle, Noverr 2013, Minot et al. 2013, Parfrey et al. 2014, Horz 2015).

La microbiota residente en el intestino grueso se ha descrito como específica de cada hospedador y relativamente estable aunque se observan cambios dependiendo de la edad (Zoetendal et al. 2002). Constituye el 60% del contenido fecal sólido y está formada por más de 400 especies, destacando la presencia de anaerobios estrictos, que son entre 100 y 1.000 veces más abundantes que los aerobios, y que están representados en un 99% por miembros de los filos Bacteroidetes y Firmicutes (Edwards, Parrett 2002, Guarner, Malagelada 2003, Gill et al. 2006, Mariat et al. 2009, Arumugam et al. 2011). El ratio Firmicutes/Bacteroidetes ha sido intensamente estudiado por su relación con uno de los trastornos más prevalentes en la actualidad tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo: el síndrome metabólico. Sin embargo, este ratio no se mantiene estable a lo largo de la vida del individuo sino que presenta valores bajos en niños y ancianos (0,4 y 0,6 respectivamente) y aumenta considerablemente en los individuos adultos (ratio 10,9).

Los principales géneros que se detectan en heces son *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* (Adlerberth 2008). Los anaerobios facultativos constituyen menos del 1% e incluyen principalmente a la familia *Enterobacteriaceae* y a los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus*, este último presente en el 80% de los

adultos. Un pequeño porcentaje de individuos sanos (~35%) también pueden contener levaduras, aunque suelen estar presentes en bajas concentraciones ( $< 10^5$  ufc/g).

Más recientemente, los investigadores del proyecto MetaHIT han observado que existen entre 1000 y 1150 especies bacterianas que son frecuentes en el intestino humano y cada persona suele albergar una media de ~160 especies (Qin et al. 2010). En los últimos 20 años, los avances en filogenética molecular han permitido la reclasificación de muchas de las especies que son particularmente abundantes en el intestino humano. Por ejemplo, las distintas especies de *Bacteroides*, previamente consideradas como el género bacteriano más frecuente y abundante en el intestino, han sido reclasificadas en cinco géneros: *Alistipes*, *Prevotella*, *Paraprevotella*, *Parabacteroides* y *Odoribacter* (Rajilic-Stojanovic, de Vos 2014).



**Figura 21. Adquisición de la microbiota humana.** A, representación esquemática de los factores por los cuales la microbiota humana se adquiere temprano en la vida y B, diversidad bacteriana en función de los factores que influyen en la adquisición temprana de la microbiota. Un recién nacido por cesárea, prematuro y alimentado con leche de fórmula presentaría la menor diversidad. Por otro lado, aquel nacido por parto vaginal, a término y alimentado con leche materna presentaría la mayor diversidad.

Cada individuo alcanza la homeostasis microbiana hacia los tres años de edad, con una composición que se mantiene relativamente estable a lo largo de la vida adulta (**Fig. 21**). Pese a la variabilidad individual observada, se han descrito -con cierta controversia- 3 enterotipos distintos y cada uno se caracteriza por la dominancia de unas pocas especies y la presencia de otras muchas que, aunque se encuentran en pequeñas cantidades, pueden ser importantes para la salud (Arumugam et al. 2011, Ottman et al. 2012). Las

especies abundantes son las responsables de la selección de las poblaciones menores. De esta manera el enterotipo 1 está enriquecido en los géneros *Bacteroides* y *Parabacteroides*, en el enterotipo 2 dominan *Prevotella* y *Desulfovibrio*, mientras que el tercero (y más frecuente) está principalmente representado por *Ruminococcus* y *Akkermansia*. Cada enterotipo muestra preferencia al empleo de unas u otras rutas metabólicas para la obtención de energía (Arumugam et al. 2011). A pesar de la descripción de diferentes enterotipos, todo parece indicar que existe una alta redundancia funcional, con un núcleo funcional bacteriano que comparte entre el 25 y 43% de las funciones enzimáticas y que es independiente del enterotipo al que se pertenezca (Vael, Desager 2009, Turnbaugh, Gordon 2009). Una vez alcanzado el estado de equilibrio, la microbiota puede sufrir alteraciones temporales o permanentes como consecuencia de diversos factores, incluyendo el sufrimiento de ciertas enfermedades, los tratamientos con antibióticos, los cambios en la dieta o las situaciones de estrés (Guarner, Malagelada 2003, Adlerberth 2008, Doré, Corthier 2010).

En la vejez tienen lugar numerosos cambios fisio-patológicos que nuevamente modulan la microbiota. No se ha definido el momento concreto en que estos cambios comienzan pero existen numerosos factores interindividuales, como los cambios nutricionales y en el estilo de vida, la mayor frecuencia de infecciones y enfermedades inflamatorias, la medicación requerida, la ralentización del tránsito gastrointestinal o la menor producción de secreciones digestivas, que parecen ser determinantes en la alteración de las poblaciones bacterianas presentes en el TGI del anciano. Estos cambios se caracterizan por la reducción de la diversidad global, un descenso de las poblaciones de los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* y *Clostridium* y un aumento del filo *Proteobacteria*, principalmente de algunos de sus miembros que pueden actuar como patógenos oportunistas (Mariat et al. 2009, Ottman et al. 2012).

En los últimos años distintos grupos de investigación se han esforzado por definir la composición y características de una “microbiota sana”, una tarea difícil si no imposible. Los cambios experimentados por las sociedades occidentales en las últimas décadas (dieta altamente procesada y enriquecida en azúcares, grasas y aditivos, aumento de la higiene, amplia exposición a antibióticos, estilo de vida sedentario...) se han relacionado con una mayor presencia de *Firmicutes* y una reducción de *Bacteroides* y *Prevotella* (relacionados con la digestión de polisacáridos vegetales) y se asocian con una mayor tendencia a la inflamación que podría ser la responsable del aumento de la incidencia de enfermedades o síndromes como la diabetes de tipo 2, la obesidad, las alergias e intolerancias alimentarias o las enfermedades inflamatorias intestinales (Spreadbury 2012, Yatsunenko et al. 2012, Bengmark 2013, Clemente et al. 2015, Warinner et al. 2015).

### II.7.2. Adquisición y evolución de la microbiota intestinal infantil

La colonización microbiana del TGI infantil es un proceso esencial en nuestra vida puesto que cada vez resulta más evidente que las interacciones iniciales que se establecen entre la microbiota y su hospedador tienen consecuencias importantes para la salud a corto, medio y largo plazo (**Fig. 21**).

#### II.7.2.1. Periodo fetal

Desde los estudios clásicos de Tissier (Tissier 1907) sobre la adquisición de la microbiota intestinal infantil, se ha aceptado la idea de que los fetos son estériles *in utero* y que la colonización bacteriana del intestino se inicia durante el tránsito por el canal del parto, por contaminación a partir de la microbiota vaginal e intestinal de la madre (Tannock 1995, Mackie et al. 1999, Isolauri et al. 2000), a pesar de la ausencia de evidencias científicas. Según dicha hipótesis, la composición inicial de la microbiota intestinal estaría determinada fundamentalmente por el tipo de nacimiento y la alimentación del recién nacido (Mackie et al. 1999). Por su parte, la principal fuente de bacterias para los niños nacidos por cesárea sería el ambiente hospitalario, incluyendo el instrumental, los equipos y la presencia de otros neonatos y del personal médico (Lennox-King et al. 1976a, Lennox-King et al. 1976b). Este punto de vista se basa en el hecho de que, durante décadas, los análisis microbiológicos de muestras biológicas relacionadas con el embarazo (corioamnios, líquido amniótico, meconio...) se llevaban a cabo únicamente en aquellos casos en que los que la presencia de una infección intrauterina era evidente. De hecho, varios estudios han encontrado una fuerte correlación entre las infecciones intrauterinas y el parto prematuro (DiGiulio et al. 2008, Goldenberg et al. 2008, Urushiyama et al. 2017).

Por el contrario, pocos estudios han examinado la microbiota uterina asociada a embarazos sanos a término, en parte debido a la perdurable influencia del paradigma del útero estéril, pero también a las dificultades éticas y técnicas para la obtención de muestras durante embarazos saludables. Sin embargo, estudios más recientes sobre la posible transmisión de bacterias a través de la barrera placentaria en condiciones fisiológicas han mostrado la existencia de bacterias (incluyendo especies de los géneros *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*) en muestras de líquido amniótico, sangre de cordón umbilical y membranas fetales en ausencia de infección o inflamación (Bearfield et al. 2002, Jiménez et al. 2008c, Jiménez et al. 2005, Rautava et al. 2012). El microbioma placentario se caracteriza, en condiciones fisiológicas, por la predominancia de especies comensales que, aunque son poco abundantes, aportan gran riqueza metabólica. Los filos dominantes son Firmicutes, Tenericutes, Proteobacteria, Bacteroides y Fusobacteria. En contraste, el parto prematuro se relaciona con una mayor presencia de miembros de los órdenes *Actinomycetales* y *Alphaproteobacteria*, y del género *Burkholderia* (Aagaard et al. 2014).

Un trabajo anterior reveló que algunos microorganismos que colonizan la placenta, como *Prevotella* spp. y *Gardnerella* spp., pueden provocar respuestas inflamatorias específicas en los neonatos, mientras que otros, como *Lactobacillus* spp., pueden suprimir estas respuestas (Fichorova et al. 2011).

Para probar si ciertas bacterias intestinales maternas pueden colonizar el útero, dos estudios pioneros demostraron que la administración oral de una cepa marcada de *Enterococcus faecium* a ratonas gestantes daba lugar a su presencia en el líquido amniótico y meconio de las crías obtenidas por cesárea (Jiménez et al. 2008c, Jiménez et al. 2005).

Por otra parte, el meconio tampoco es estéril como se suponía anteriormente sino que alberga una compleja comunidad microbiana propia que difiere de la existente en las heces infantiles (Ardissone et al. 2014, Gosalbes et al. 2013, Hu et al. 2013, Jiménez et al. 2008c, Moles et al. 2013). El meconio se considera un reflejo de la materia fecal acumulada durante la gestación y por tanto su contenido microbiano es un fiel reflejo de la colonización prenatal del intestino.

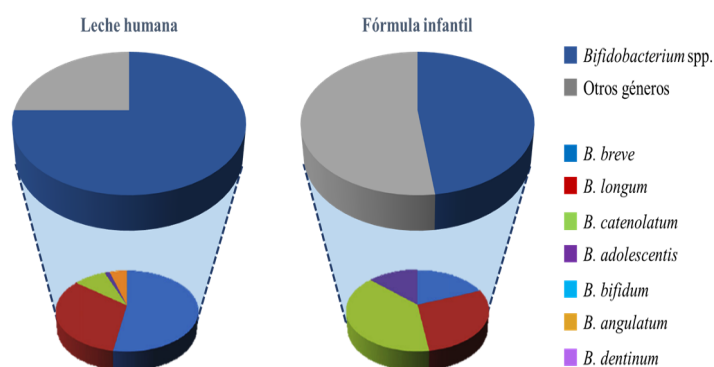
Los estudios citados anteriormente sugieren que la colonización bacteriana del intestino humano es un proceso complejo que se inicia, a pequeña escala, en las últimas fases del periodo fetal (Funkhouser, Bordenstein 2013).

#### II.7.2.2. *Nacimiento y periodo postnatal*

Tras el nacimiento, el proceso de colonización se intensifica drásticamente debido al contacto del neonato con microorganismos procedentes de las microbiotas vaginal, intestinal y/o mamaria de la madre y del medio ambiente que le rodea (Mackie et al. 1999, Buddington et al. 2010, Fernández et al. 2013b, Sharon, Banfield 2013). En consecuencia, diversos factores, como la composición de la microbiota materna, la edad gestacional, la forma y lugar de nacimiento, la medicación (particularmente la antibioterapia) o la alimentación, juegan papeles claves en un proceso del que dependen funciones tan importantes como la absorción de nutrientes, la formación de una barrera frente a patógenos, el neurodesarrollo o la maduración del sistema inmunitario (Penders et al. 2006, Adlerberth 2008, Dominguez-Bello, Blaser 2008, Khachatryan et al. 2008, Martino et al. 2008, Mshvildadze et al. 2010, Johnson, Versalovic 2012, Lee et al. 2013, Rodríguez 2015, Houghteling, Walker 2015a, Houghteling, Walker 2015b, Rutayisire et al. 2016b, Rutayisire et al. 2016a, Cong et al. 2016, Dabrowska, Witkiewicz 2016, Turpin et al. 2016, Liu 2016, Duranti et al. 2017b). (**Fig. 22**)

Las primeras semanas de vida constituyen el periodo más dinámico en el ecosistema gastrointestinal. La microbiota infantil se caracteriza por concentraciones bacterianas más bajas que las existentes en el intestino de un adulto, por la mayor abundancia de bifidobacterias, *Clostridium leptum* y

*Clostridium coccoides*, anaerobios facultativos y por una menor tasa *Firmicutes/Bacteroidetes* (Adlerberth 2008, Mariat et al. 2009). Además, en esta fase, diversas bacterias anaerobias facultativas (estreptococos, estafilococos, bacterias lácticas, enterobacterias) colonizan y dominan el intestino infantil (Jiménez et al. 2008c). La presencia de tales bacterias resulta crítica ya que son esenciales para la modulación inicial del SI y la creación de un ambiente reductor que permita el desarrollo y dominio posterior de bacterias anaerobias estrictas, como las pertenecientes a diversas especies de los géneros *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Ruminococcus* o *Clostridium* (Sakata et al. 1985, Adlerberth 2008, Vael, Desager 2009, Echarri et al. 2011, Scholtens et al. 2012, Matamoros et al. 2013, Sharon, Banfield 2013).



**Figura 22. Bifidobacterias en las heces de niños recién nacidos alimentados con leche humana o con fórmula infantil.** En el primer gráfico se representa el porcentaje de bacterias del género *Bifidobacterium* sobre el resto de géneros. Los gráficos inferiores muestran la proporción de especies diferentes de bifidobacterias. Sin contar a *Bifidobacterium infantis*, que es dominante con una proporción similar en los grupos. Modificado de Oozeer et al 2013.

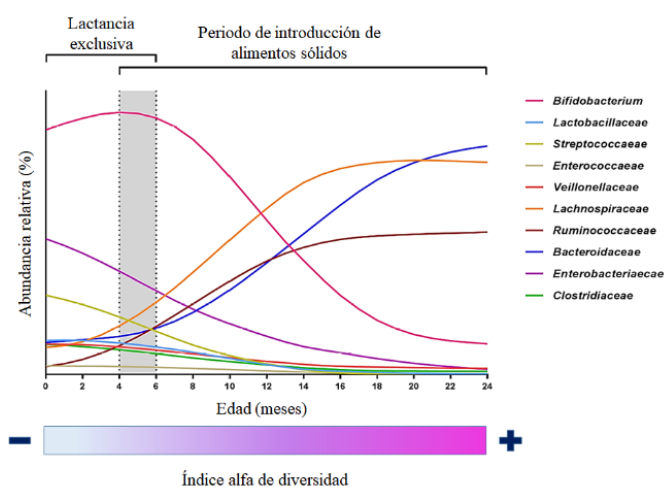
La sucesión de comunidades microbianas en el TGI durante la infancia es un proceso tan complejo como desconocido. El aumento progresivo tanto en la concentración de microorganismos como en el número de especies conduce a un rápido enriquecimiento en la cantidad de genes funcionales de origen microbiano. Numerosos estudios centrados en la estructura de la comunidad microbiana durante la infancia han apuntado a la introducción de alimentos sólidos como momento de mayor impacto en el cambio del patrón microbiómico en los niños amamantados (Favier et al. 2002, Favier et al. 2003, Koenig et al. 2011) (**Fig. 23**). Sin embargo, un estudio reciente ha señalado que realmente el factor determinante en dicho cambio no es la introducción de nuevos alimentos sino el momento en el que cesa la lactancia (Bäckhed et al. 2015). Así, estos investigadores encontraron más taxones característicos de adultos en el microbioma de los niños que se destetaron precozmente mientras que el de los niños que recibieron lactancia materna durante más tiempo estaba dominado por bacterias presentes en la leche humana.

En general, se estima que los grupos microbianos dominantes en la microbiota intestinal de los niños de 2-3 años son similares a los de los adultos, aunque todavía existen diferencias en cuanto a las especies presentes (Favier et al. 2002, Ottman et al. 2012, Scholtens et al. 2012, Yatsunenko et al. 2012). Hacia el final de la adolescencia se alcanza el clímax y, a partir de entonces, este



ecosistema muestra una elevada estabilidad en adultos sanos (Franks et al. 1998, Zoetendal et al. 1998). En cualquier caso, la microbiota del TGI humano parece ser específica de cada individuo (Simon, Gorbach 1982, Moore, Moore 1995, Franks et al. 1998).

**Figura 23. Evolución de los principales géneros bacterianos en la microbiota intestinal del recién nacido durante sus primeros meses de vida.** La microbiota cambia en el momento que lo hace la dieta de los niños, favoreciendo los nuevos alimentos el desarrollo de otros géneros en detrimento de los presentes. (Modificado de Laursen et al 2017).



Existe un gran interés por conocer el desarrollo de la microbiota del intestino infantil y su influencia sobre el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma del niño. Sin embargo, por el momento los conocimientos firmes sobre este tema son todavía relativamente escasos a pesar del elevado número de estudios que se han realizado hasta la fecha. Hay situaciones especiales, como es el caso de niños prematuros y/o expuestos a antibióticos de amplio espectro, de las que aún se tienen muy pocos conocimientos.

### II.7.2.3. Funciones de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal ejerce papeles esenciales para la fisiología de su anfitrión a pesar de que todavía desconocemos parte de tales funciones y/o los mecanismos responsables de las mismas (Lloyd-Price et al. 2017). Estas funciones no se limitan en absoluto al ámbito intestinal sino que interacciona con las microbiotas existentes en otras mucosas y epitelios y prácticamente con la totalidad de sistemas y aparatos del organismo (McFall-Ngai et al. 2013). En este sentido, no es de extrañar que las disbiosis intestinales se estén relacionando, de una forma creciente, con un amplio abanico de enfermedades locales o sistémicas entre las que se incluyen la diabetes tipo 2, el síndrome de intestino irritable, las enfermedades inflamatorias intestinales, el cáncer de colon, el síndrome metabólico y la obesidad, la aterosclerosis, el lupus eritematoso, la endocarditis y diversos trastornos psíquicos como el autismo, ansiedad y depresión (Warinner et al. 2015). A continuación, se describirán brevemente algunas de las funciones particularmente relevantes durante la colonización inicial del intestino infantil.

En primer lugar, su función metabólica resulta obvia, no sólo por su acción metabólica directa sobre los componentes de la dieta sino también por la capacidad de regular la expresión de genes humanos implicados en el



metabolismo de nutrientes (Hooper et al. 2002). Una de las principales funciones metabólicas de nuestra microbiota es la generación de nutrientes asimilables mediante la fermentación del mucus producido por el epitelio y de diversos compuestos que las células humanas no pueden digerir (oligosacáridos de la leche humana, celulosa, hemicelulosa, almidón resistente, pectinas...). El resultado final es la generación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), principalmente acetato, propionato y butirato, responsables de funciones muy importantes tanto al nivel intestinal, incluyendo la correcta diferenciación celular del epitelio intestinal y la absorción de iones como calcio, magnesio y hierro (Guarner 2003, Adlerberth 2008), como al sistémico (Guarner, Malagelada 2003, Houghteling, Walker 2015a). No es de extrañar que la cuantificación de los SCFA (y, especialmente, del butirato) sea un marcador de la actividad metabólica de la microbiota intestinal (Rodríguez-Castano et al. 2017). Recientemente, se ha observado que la microbiota de los niños con cólico del lactante se caracteriza por una menor cantidad de microorganismos productores de butirato que la de los niños sanos (de Weerth et al. 2013a, de Weerth et al. 2013b). La microbiota también es capaz de aportar aminoácidos y proteínas y participa en la biosíntesis de vitaminas y en la detoxificación o eliminación de compuestos perjudiciales para la salud (Sanz et al. 2004). Globalmente, se considera que la actividad metabólica de nuestra microbiota es comparable a la del hígado (Shanahan 2004, He et al. 2015).

En los últimos años se ha prestado gran atención a la posible relación entre la composición de la microbiota, el síndrome metabólico y la obesidad (Turnbaugh et al. 2006, Ley et al. 2006, Turnbaugh, Gordon 2009). La microbiota de individuos obesos se caracteriza por la disminución del ratio *Bacteroidetes/Firmicutes*, importante en la regulación del metabolismo energético y en la formación de los depósitos de grasa. Esta regulación es mediada por diversas señales, incluyendo los SCFA producidos por la microbiota que activan receptores que se expresan preferentemente en los adipocitos e intercambian señales con el hipotálamo y otras áreas del cerebro (He et al. 2015, Schele et al. 2016). El butirato estimula la producción de leptina en los adipocitos e induce la secreción de diversos neuropéptidos relacionados con la modulación de la ingesta y el metabolismo lipídico y de la glucosa (El Aidy et al. 2015a, He et al. 2015).

Las poblaciones constituyentes de un ecosistema superpoblado, como es la microbiota intestinal, interactúan entre sí hasta alcanzar un estado de equilibrio en el que sus miembros tratan de evitar la incorporación de microorganismos transeúntes (Di Mauro et al. 2013). Entre los mecanismos de defensa destacan la competencia por los recursos disponibles y la producción de numerosos metabolitos resultantes de la interacción entre la microbiota y el hospedador (Vogt et al. 2015), incluyendo diversas sustancias antimicrobianas, tanto de origen procariota como eucariota.

Pese al desconocimiento exacto de los mecanismos que determinan el equilibrio simbiótico entre hospedador y microbiota, la interacción con los primeros colonizadores parece crucial en la maduración y modulación del sistema inmunitario del hospedador (Min, Rhee 2015). En consecuencia, la adquisición de la microbiota intestinal es un factor fundamental para la maduración del sistema inmunitario innato y adquirido desde el nacimiento. En este sentido, los receptores de reconocimiento de patrones (PRR; del inglés, *Pattern Recognition Receptors*), como los receptores de tipo Toll (TLR; del inglés, *Toll-Like Receptors*) o de tipo Nod (NLR; del inglés, *Nod-Like Receptors*), específicos del sistema inmunitario innato y expresados por las células eucariotas, son capaces de reconocer motivos microbianos muy conservados. (Cario 2005, Abreu 2010). Esta interacción provoca una cascada de señalización celular que conduce a las distintas respuestas celulares responsables de dirigir la respuesta inmunitaria adquirida. Obviamente, las respuestas son diferentes si se establece contacto con una bacteria patógena que si se hace con una bacteria comensal, mutualista o probiótica (Weng, Walker 2013).

Estas últimas bacterias también intervienen en la maduración de las células T helper (Th) y en su diferenciación a células Th1, Th2, Th17 y T<sub>reg</sub>, asegurando una respuesta de base celular adecuada para el mantenimiento de la homeostasis (Walker 2008, Swiatczak, Rescigno 2012). En condiciones fisiológicas, los fetos a término y los RN se caracterizan por una respuesta predominantemente de tipo Th2. Con la intensificación de la colonización postnatal, el sistema inmunitario equilibra esa situación al recibir un notable estímulo antigénico de tipo pro-Th1. Si por cualquier motivo (como una baja exposición a microorganismos), este cambio no se produce y prevalecen las respuestas Th2, aumentará notablemente el riesgo de padecer problemas alérgicos (Di Mauro et al. 2013).

Es importante señalar que una correcta interacción entre los microorganismos y el SI en las primeras etapas de la vida conduce al establecimiento de la tolerancia oral, situación caracterizada por una reducción de la respuesta inmunitaria frente a bacterias no patógenas y antígenos alimentarios mediante la activación de las células T<sub>reg</sub> (Borruel et al. 2003, Walker 2008). Es más, la correcta adquisición de la microbiota al principio de la vida posee efectos inmunitarios funcionales a corto, medio y largo plazo, por lo que se trata de un condicionante de salud en la vida futura (Stockinger et al. 2011, Renz 2013, Weng, Walker 2013, White et al. 2013). De hecho, diversos autores sugieren la existencia de un periodo crítico (o ventana de tiempo) durante los primeros días de vida en el que se debe adquirir una microbiota “saludable” para reducir el riesgo de sufrir diversas enfermedades a lo largo de la vida (Renz et al. 2011, Fouhy et al. 2012, Sim et al. 2013, El Aidy et al. 2015a). El equilibrio entre los procesos de tolerancia y de activación inmunológica depende de

numerosos factores entre los que se incluyen el bagaje genético, el tipo y dosis del antígeno, la edad de la primera exposición, su frecuencia de administración, el estado inmunológico del hospedador o la vía de exposición.

Diversos estudios epidemiológicos y ensayos *in vivo* han mostrado que el patrón de colonización del intestino en las primeras etapas de la vida influye de manera relevante en el desarrollo postnatal del SNC y este hecho puede tener consecuencias a largo plazo (Begega et al. 2010, Collins et al. 2012). La comunicación entre la microbiota y el sistema nervioso central se establece por diferentes vías que incluyen la inducción de la secreción de neuropéptidos en el intestino, la estimulación del nervio vago y de otros nervios o la señalización a través de mediadores inmunológicos (Allen-Blevins et al. 2015, Dinan et al. 2015, Dinan, Cryan 2015, Cong et al. 2016, Yarandi et al. 2016). Existe también una influencia indirecta mediada por los cambios en la motilidad, la permeabilidad y las secreciones intestinales. Además, datos recientes destacan la implicación de distintos productos del metabolismo bacteriano en el diálogo cerebro-intestinal (Di Mauro et al. 2013, El Aidy et al. 2015a) (**Fig. 20**)

Los SCFA también parecen desempeñar un papel determinante en la comunicación y regulación de este eje (El Aidy et al. 2015a, Schele et al. 2016). Estas sustancias estimulan la motilidad del TGI y la producción de serotonina, importante neurotransmisor cuya deficiencia está directamente relacionada con los síntomas de depresión. Los productos bacterianos contactan con el epitelio intestinal estimulando las células enteroendocrinas del SNE, capaces de producir neuropéptidos inhibitorios o excitadores que difunden en la lámina propia. El sistema nervioso entérico, cuya función es la regulación del flujo sanguíneo y de la motilidad gastrointestinal, requiere de la interacción con SI y microbiota para su correcto funcionamiento y el mantenimiento de la homeostasis (El Aidy et al. 2015a).

En consecuencia, existe un creciente interés en el desarrollo de estrategias que permitan modular el proceso de establecimiento de la microbiota infantil. Para desarrollar con éxito tales estrategias, resulta fundamental un conocimiento detallado de la microbiota y del microbioma de la pareja madre-hijo y, también, del proceso de establecimiento de la microbiota intestinal en los niños.

### II.7.3. Modulación de la microbiota intestinal materno-infantil

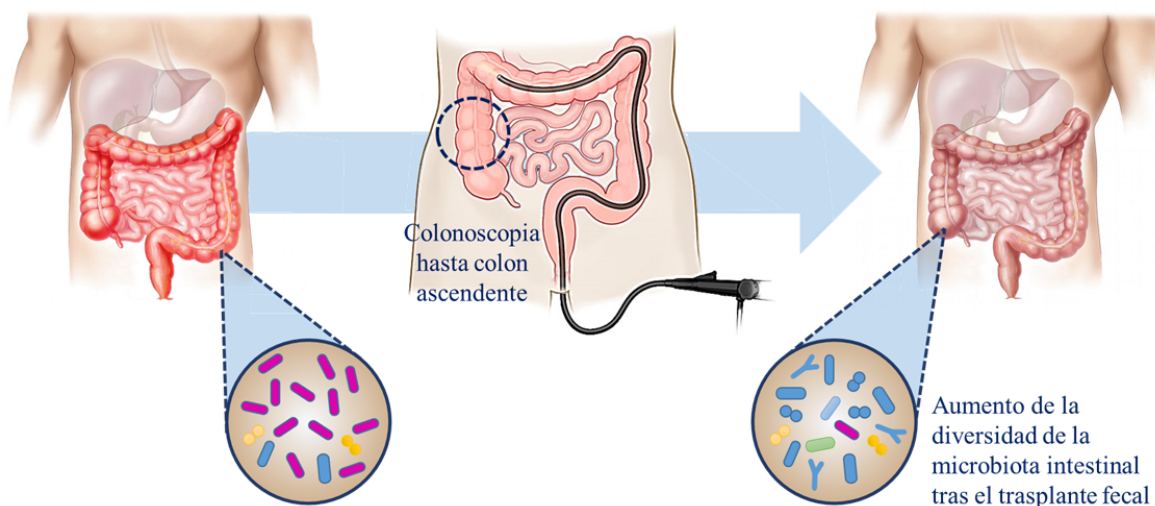
Existen diversas estrategias para la modulación de la microbiota materno-infantil; entre ellas destacan (1) la dieta; (2) los probióticos, prebióticos y simbióticos; (3) el trasplante fecal; y (4) las microbiotas mínimas o sintéticas. La modificación de la dieta parece una herramienta particularmente interesante para la modulación de la microbiota pero el conocimiento actual en este campo

es todavía muy limitado. A continuación, se tratará con un poco más de detalle el empleo de probióticos, el trasplante fecal y las microbiotas mínimas.

Una de las estrategias podría ser la aplicación de probióticos específicamente seleccionados para dicha población. Como se ha indicado en otra parte de esta Introducción (Capítulo II. 5.), las propiedades probióticas dependen de cada cepa; es decir, cuando se adscribe un efecto probiótico a una cepa, no se puede extrapolar esa propiedad a las restantes cepas de la misma especie. Además, la adscripción de un efecto probiótico de una cepa depende, entre otros factores, de la dosis, forma de administración, sistema de producción y condiciones de almacenamiento.

La administración de probióticos podría jugar un papel relevante en la reducción de la mortalidad y la morbilidad asociada a las infecciones infantiles mediante la prevención de la migración bacteriana a través de las mucosas, la exclusión competitiva de bacterias potencialmente patógenas y la mejora de la respuesta inmunitaria del huésped. Por otra parte, la ingestión de probióticos durante el último trimestre del embarazo tiene un efecto modulador de la microbiota y la secreción de citoquinas en los ecosistemas vaginal y mamario, hecho que podría tener posibles implicaciones dentro de las estrategias futuras para la prevención del parto prematuro (Vitali et al. 2012) y de las mastitis (Fernández et al. 2016). En este mismo sentido, también existen indicios de que la administración de bacterias probióticas a la madre durante el posparto podría contribuir a disminuir la incidencia de enterocolitis necrotizante en los lactantes alimentados con leche materna (Benor et al. 2014). Recientemente, se ha demostrado que el sobrenadante obtenido a partir del cultivo de una cepa probiótica impide el parto prematuro inducido por LPS y reduce la inflamación en ratonas gestantes (Yang et al. 2014).

Actualmente, el trasplante o transferencia fecal ha despertado un gran interés como método para modificar ecosistemas microbianos complejos en situaciones patológicas. Consiste en administrar una suspensión de heces obtenida de una persona sana a otra persona mediante sonda, colonoscopia o enema. Es decir, se transfiere la microbiota intestinal de una persona a otra, incluyendo no sólo los microorganismos cultivables sino también los que actualmente no se pueden cultivar y que, en consecuencia, no se pueden administrar en forma de un probiótico convencional (**Fig. 24**). Realmente, se trata de un proceso natural que ocurre en la vida temprana, por ejemplo, durante el tránsito por el canal del parto, y que se ha practicado de forma empírica desde hace miles de años. La principal razón para la popularidad de los trasplantes fecales es la eficacia tan elevada que han mostrado en el tratamiento de ciertas enfermedades muy difíciles de controlar y, especialmente, en la infección recurrente por *Clostridium difficile* (Bakken et al. 2011, Gough et al. 2011, van Nood et al. 2013). Igualmente, se ha descrito el éxito del trasplante fecal para el tratamiento de infecciones infantiles causadas por microorganismos resistentes a antibióticos (de Vos 2013).



**Figura 24. Esquema del proceso de un trasplante fecal.**

Sin embargo, el trasplante fecal se enfrenta a problemas prácticos importantes, derivados de la extraordinaria complejidad microbiológica, inmunológica y bioquímica de las heces, cuya composición puede variar incluso dentro de una misma persona, dependiendo de numerosos factores. Por ejemplo, las heces podrían convertirse en fuente de sustancias nocivas o de microorganismos que puedan representar un problema para la salud a medio y largo plazo. Por otro lado, se trata de una muestra biológica que es imposible de estandarizar, lo que limita su aplicación a gran escala. Por lo tanto, existe la necesidad de diseñar y desarrollar nuevos procesos biotecnológicos que permitan aplicar el principio de la transferencia fecal de una forma reproducible.

En este sentido, el concepto de comunidades microbianas mínimas, específicas para un nicho concreto, puede abrir nuevas vías terapéuticas para modificar la microbiota intestinal de personas con diversas patologías (Allen-Vercoe et al. 2012, de Vos 2013). Recientemente, se ha descrito la eficacia de un sustituto de la microbiota intestinal, elaborado a partir de los cultivos puros de 33 especies bacterianas aisladas de heces de un único donante sano (Proyecto *RePOOPulating*), para tratar casos de infección recurrente por *C. difficile* en los que la antibioterapia había fracasado (Petrof et al. 2013). Este estudio pionero demostró, por primera vez, que una microbiota mínima diseñada en el laboratorio es capaz de curar infecciones resistentes a los antibióticos.

Las ventajas de las comunidades microbianas mínimas son fácilmente perceptibles ya que permiten: (a) controlar la composición de las mezclas de cepas; (2) garantizar la ausencia de sustancias nocivas y patógenos, incluyendo virus; y (c) fabricación a escala industrial y de forma reproducible mediante procesos biotecnológicos. De hecho, la producción aséptica de mezclas de cepas viables (bien liofilizadas o congeladas) en fermentadores industriales es una

tecnología bien conocida que se emplea en la producción de cultivos iniciadores o probióticos. La implementación de estas comunidades microbianas sintéticas en terapias de última generación sería de gran beneficio para los pacientes y, además, permitiría avanzar en nuestra comprensión del microbioma intestinal humano. Serán necesarios muchos estudios para definir las funciones que deben desempeñar los componentes de un microbioma mínimo para la prevención o el tratamiento de las infecciones. En cualquier caso, el desarrollo de comunidades bacterianas definidas, representativas de las que existen en leche humana o en las heces de los lactantes en condiciones fisiológicas, supone un enfoque atractivo para la prevención y el tratamiento de infecciones en la población prematura en el contexto de la creciente aparición de bacterias patógenas multirresistentes.





## CAPÍTULO III

---

# MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS





## CAPÍTULO III. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

La leche humana contiene una microbiota fisiológica propia dominada por estafilococos, estreptococos, corinebacterias y bacterias lácticas. Sin embargo, existen diversos factores que pueden conducir a una mastitis infecciosa. Este proceso de disbiosis microbiana se caracteriza por una pérdida de biodiversidad, un notable aumento de la concentración del agente causal y una reducción, e incluso desaparición, del resto de las bacterias en este fluido biológico. Se trata de una patología frecuente durante la lactancia, llegando a tasas del 33% de las mujeres lactantes y constituyendo la principal causa médica de destete precoz. Debido a la importancia de la lactancia materna para la salud del neonato a corto, medio y largo plazo, esta enfermedad debería ser considerada un problema de Salud Pública relevante.

A pesar de ello, la mastitis humana ha sido un problema subestimado e infradiagnosticado hasta la fecha. Este hecho se debe a que únicamente son considerados como tales las mastitis agudas, que cursan con una sintomatología muy florida, ignorándose ampliamente las subagudas, que son las más frecuentes. A ello se suma la falta de tradición en el análisis de la leche humana y, en consecuencia, la ausencia de protocolos estandarizados para la recolección de este tipo de muestras y de criterios para la interpretación de los resultados. En la práctica, y ante la ausencia de un diagnóstico etiológico se suele recurrir a un tratamiento empírico, generalmente basado en antibióticos de amplio espectro. Sin embargo, la eficacia de estos tratamientos es cada vez menor debido al aumento de la resistencia a los antibióticos prescritos entre los agentes etiológicos de esta infección.

La modulación de la microbiota mediante el empleo de probióticos es una estrategia atractiva como complemento o alternativa a la antibioterapia en el marco del auge de las resistencias a los antibióticos. Los probióticos se definen como bacterias vivas que, administradas en cantidades adecuadas, confieren un efecto beneficioso al hospedador. Actualmente se sabe que algunas cepas de lactobacilos aisladas de leche humana son eficaces en el tratamiento de las mastitis pero los mecanismos mediante los cuales ejercen esa acción siguen siendo, en gran medida, desconocidos. En consecuencia, es necesario determinar parámetros que sirvan como indicadores del efecto de los probióticos en los casos de mastitis. Por otra parte, estudios recientes sugieren que algunas de estas cepas podrían trascolar de manera fisiológica desde el tracto gastrointestinal hasta la glándula mamaria y, una vez allí, serían capaces de restablecer el equilibrio de la microbiota. La correcta composición de la microbiota de la leche humana es relevante ya que parece jugar un papel relevante en la colonización inicial del intestino infantil.

Cada vez parece más evidente que el riesgo de sufrir diversas enfermedades a lo largo de la vida está en relación al proceso de adquisición de

la microbiota en los primeros años de la vida. En general, se considera que el prototipo ideal de microbiota gastrointestinal durante el periodo infantil es la existente en los niños sanos, nacidos por parto vaginal tras un embarazo a término sin ninguna complicación, que no han recibido medicación y que se han alimentado con leche de la propia madre. Sin embargo, este estándar de colonización puede verse alterado por numerosos factores, incluyendo la base genética y epigenética del individuo, su edad gestacional, el tipo de parto, la forma de alimentación, el ambiente en el que reside o el uso de antibióticos y otros medicamentos. Precisamente la microbiota humana es particularmente modulable durante el periodo infantil y, como se ha señalado, la forma como se module puede repercutir en la salud de esa persona durante el resto de su vida. En ese sentido, el empleo de probióticos en la población infantil ha aumentado notablemente en los últimos años, especialmente para la corrección de ciertos trastornos gastrointestinales; además, parece muy prometedor para otros objetivos, particularmente en relación con el correcto desarrollo de las funciones cognitivas durante la infancia.

En cualquier caso, las cepas probióticas deben ser cuidadosamente seleccionadas en función de la población y el objetivo a la que van destinadas. Para determinar la seguridad, tolerancia y eficacia son necesarios ensayos clínicos bien diseñados que permitan verificar los efectos observados previamente en las pruebas *in vitro*.

En este contexto, los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

PRIMERO: Analizar el metagenoma de muestras de leche humana procedente de mujeres sanas y de mujeres que padecen mastitis, y determinar las diferencias existentes dependiendo del estado de salud mamaria.

SEGUNDO: Determinar el efecto de la administración de la cepa *Lactobacillus salivarius* PS2, aislada de leche humana, a mujeres sanas y a mujeres que padecen mastitis. Evaluar si se trata de una cepa eficaz para el tratamiento de las mastitis e identificar aquellos parámetros microbiológicos, bioquímicos, inmunológicos que pudieran ser utilizados en el futuro como marcadores asociados al efecto de la cepa.

TERCERO: Estudiar el posible proceso fisiológico de translocación entero-mamaria durante la gestación en un modelo animal, mediante el marcaje genotípico y fenotípico de *Lactobacillus salivarius* PS2.

CUARTO: Evaluar si la administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, son capaces de ejercer una modulación microbiológica e inmunológica en prematuros de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer.

QUINTO: Evaluar si la administración de las cepas comerciales *Bifidobacterium infantis* R0033, *Lactobacillus helveticus* R0052 y *Bifidobacterium bifidum* R0071 a una población de niños sanos de entre 3 a 12 meses de edad es segura, resulta bien tolerada y provoca efectos moduladores en su microbioma y sistema inmunitario.





## CAPÍTULO IV

---

## PUBLICACIONES



## CAPÍTULO IV. PUBLICACIONES

IV.1. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women.

IV.2. Milk and blood biomarkers associated to the clinical efficacy of a probiotic for the treatment of infectious mastitis

IV.3. Gene expression modulation of milk somatic cells of women with mastitis in response to the consumption of *Lactobacillus salivarius* PS2

IV.4. Physiological translocation of lactic acid bacteria during pregnancy contributes to the composition of the human milk microbiota

IV.5. Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study

IV.6. Safety and tolerance of three probiotic strains in healthy infants: a multi-centre randomized, double-blind, placebo-controlled trial

IV.7. A placebo-controlled, double-blind, randomized study to investigate the effect of three probiotic strains on infants' gut microbial and immunological composition





#### IV.1. Metagenomic analysis of milk of healthy and mastitis-suffering women

Jiménez E, de Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martínez-Blanch JF, Codoñer FM, Ramón D, Fernández L, Rodríguez JM.

J Hum Lact. 2015 Aug;31(3):406-15. doi: 10.1177/0890334415585078. Epub 2015 May 6.



## Original Research



Journal of Human Lactation  
1–10  
© The Author(s) 2015  
Reprints and permissions:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0890334415585078  
jhl.sagepub.com  
**SAGE**

# Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women

Esther Jiménez, PhD<sup>1,2</sup>, Javier de Andrés, MSc<sup>1,2</sup>,  
Marina Manrique, MSc<sup>3</sup>, Pablo Pareja-Tobes, MSc<sup>3</sup>,  
Raquel Tobes, PhD<sup>3</sup>, Juan F. Martínez-Blanch, PhD<sup>4</sup>,  
Francisco M. Codoñer, PhD<sup>4</sup>, Daniel Ramón, PhD<sup>4</sup>,  
Leónides Fernández, PhD<sup>1,2</sup>, and Juan M. Rodríguez, PhD<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Background:** Some studies have been conducted to assess the composition of the bacterial communities inhabiting human milk, but they did not evaluate the presence of other microorganisms, such as fungi, archaea, protozoa, or viruses.

**Objective:** This study aimed to compare the metagenome of human milk samples provided by healthy and mastitis-suffering women.

**Methods:** DNA was isolated from human milk samples collected from 10 healthy women and 10 women with symptoms of lactational mastitis. Shotgun libraries from total extracted DNA were constructed and the libraries were sequenced by 454 pyrosequencing.

**Results:** The amount of human DNA sequences was  $\geq 90\%$  in all the samples. Among the bacterial sequences, the predominant phyla were *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes*. The healthy core microbiome included the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, and *Propionibacterium*. At the species level, a high degree of inter-individual variability was observed among healthy women. In contrast, *Staphylococcus aureus* clearly dominated the microbiome in the samples from the women with acute mastitis whereas high increases in *Staphylococcus epidermidis*-related reads were observed in the milk of those suffering from subacute mastitis. Fungal and protozoa-related reads were identified in most of the samples, whereas *Archaea* reads were absent in samples from women with mastitis. Some viral-related sequence reads were also detected.

**Conclusion:** Human milk contains a complex microbial metagenome constituted by the genomes of bacteria, archaea, viruses, fungi, and protozoa. In mastitis cases, the milk microbiome reflects a loss of bacterial diversity and a high increase of the sequences related to the presumptive etiological agents.

## Keywords

breastfeeding, human milk, mastitis, metagenome, microbiome

## Well Established

*Human milk is a source of bacteria that play a role in the initiation and evolution of the neonatal gut microbiota; however, microbiome approaches conducted up to the present have been focused on bacteria, and the only previous metagenomic study was performed by pooling samples from different women.*

## Newly Expressed

*Human milk contains a complex microbial metagenome constituted by the genome of bacteria, archaea, viruses, fungi, and protozoa. The metagenome of milk from healthy women differs from that of women with mastitis. Some technical aspects should be taken into account while determining the microbiome of samples with a relatively low bacterial concentration, such as milk obtained from healthy women.*

## Background

Our knowledge of the structure and dynamics of the human microbial community is essential for gaining a complete understanding of human development and physiology.<sup>1</sup> The human microbiota is a complex community that contains

<sup>1</sup>Department of Nutrition, Food Science and Technology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

<sup>2</sup>ProbiSearch, Tres Cantos, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Era7 Bioinformatics, Granada, Spain

<sup>4</sup>Lifesequencing S.L., Parc Científic Universitat de València, Paterna, Spain

Date submitted: December 23, 2014; Date accepted: April 3, 2015.

### Corresponding Author:

Juan M. Rodríguez, PhD, Department of Nutrition, Food Science and Technology, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain.  
Email: jmrodrig@ucm.es

archaea, bacteria, protozoa, and viruses, and the genes they contain are known as our microbiome. There is a rapidly growing awareness of the importance of the human microbiome in health and disease,<sup>2</sup> since its perturbation has been associated with several conditions, including irritable bowel syndrome, inflammatory intestinal diseases, colorectal cancer, necrotizing enterocolitis, obesity, and diabetes.<sup>3</sup>

Human milk is a relevant factor in the initiation, development, and composition of the neonatal gut microbiota.<sup>4</sup> This biological fluid represents a continuous source of bacteria to the infant gut<sup>5,6</sup> and also provides prebiotic human milk oligosaccharides.<sup>7</sup> It has been suggested that exposure of the breast-fed infant to such a wealth of bacterial phylotypes may exert beneficial effects against diarrheal and respiratory diseases and may reduce the risk of developing other conditions, such as diabetes or obesity.<sup>8</sup> A relatively narrow spectrum of bacteria, including staphylococci, streptococci, lactic acid bacteria, and bifidobacteria, has been isolated from human milk of healthy women,<sup>9-14</sup> whereas bacterial DNA from a wider spectrum of bacterial species, including strict anaerobes, has been detected using culture-independent approaches.<sup>8,15-19</sup>

Numerous microbiome studies have been carried out to assess the composition of the bacterial communities inhabiting a variety of human body locations, including gut,<sup>20</sup> oral cavity,<sup>21,22</sup> vagina,<sup>1,23,24</sup> skin,<sup>25,26</sup> and milk.<sup>8,17-19</sup> All of these studies were focused on the bacterial component of the microbiome, but in general they did not evaluate the presence of sequences related to other microorganisms, such as fungi, archaea, protozoa, or viruses, even though they may also exert a strong influence on human health.<sup>3</sup>

In this context, the objective of this work was to obtain a more comprehensive metagenomic profile of the human milk microbial community in 2 different health conditions (healthy and mastitis) by using a whole community DNA shotgun sequencing-based approach.

## Methods

### Subjects, Sampling, and Milk Cultures

A total of 20 human milk samples were analyzed in this study. Samples were obtained from 10 healthy women without present or past underlying conditions (H1-H10), and from 10 women with symptoms of lactational mastitis—5 suffering from acute mastitis (breast redness and pain, fever, flu-like symptoms) (M1-M5) and the other 5 suffering from subacute mastitis (needle-like and burning pain, engorgement) (M6-M10).<sup>27</sup> Neither antibiotics nor probiotics were administered to the women for at least 3 months prior to sample collection. All volunteers gave written informed consent to the protocol, which was approved by the ethical committee of Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain (reference 10/017-E).

Milk samples were collected aseptically in a sterile tube by manual expression using sterile gloves. Previously, nipples

and mammary areola had been cleaned with soap and sterile water and soaked in chlorhexidine (Cristalmina, Salvat, Spain). The first drops (~500  $\mu$ L) were discarded.

Immediately after collection, the milk samples were plated onto Baird Parker (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), ColumbiaNadilixicAcid (BioMérieux), MacConkey (BioMérieux), Pseudomonas Agar Base (CFC formulation; Oxoid, Basingstoke, UK), Brain Heart Infusion (Oxoid), and Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (BioMérieux) agar plates to identify and quantify the bacteria or the yeasts (in the case of the last medium) initially present in the samples. The isolates were identified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a Vitek-MS instrument (BioMérieux) in the facilities of Probisearch (Tres Cantos, Spain). Briefly, a portion of a bacterial colony (~1  $\mu$ L) was directly spotted onto a MALDI sample plate. Then, it was overlaid with 1  $\mu$ L of a saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in acetonitrile (28%) and allowed to dry at room temperature. For each isolate, a mean spectrum was constructed with at least 50  $m/z$  spectra profiles and used for the identification by comparison with the spectra contained in the Myla database (BioMérieux). Identification was defined as a 99% to 100% match to the species-specific  $m/z$  values in the database.

### DNA Isolation from Human Milk

Different quantities of milk were used to obtain  $\geq 500$  ng of DNA. The protocol was as follows: milk (~10 mL) was centrifuged at 11 000 $\times g$  for 5 minutes at 4°C; the pellet was washed with TE buffer (10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8) and resuspended in 0.5 mL of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% w/v SDS, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 20 mg/mL lysozyme, 5  $\mu$ g/mL lysostaphin) and 0.3 mL of 3 M sodium acetate. Then, mechanical lysis was performed by bead-beating with 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Sigma, St Louis, Missouri, USA) using a FastPrep instrument (QBioGene, Irvine, California, USA) at a speed of 5.5 m/s for 30 seconds, twice. The lysate solution was treated with 50  $\mu$ L of proteinase K (2 mg/mL) (Sigma) for 60 minutes at 37°C. Following incubation, 0.1 mL of 1.5 M NaCl was added to the lysate and mixed. After incubation for 5 minutes at room temperature, the mixture was centrifuged at 16 000 $\times g$  for 5 minutes at room temperature to pellet any insoluble cell debris. The supernatant was transferred into a new tube and extracted twice with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) (Sigma). The DNA was precipitated by adding 0.6 volumes of isopropanol (Sigma) and incubation at -20°C for 1 hour. The DNA was pelleted at 16 000 $\times g$  for 10 minutes at 4°C, washed with 70% ethanol (v/v), allowed to air dry, and finally, resuspended in TE buffer. Total DNA was quantified using a NanoDrop ND-1000 UV spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, Delaware, USA).



### Pyrosequencing and Taxonomic Assignment

Shotgun libraries from total extracted DNA were constructed for the 20 samples and, subsequently, were sequenced at Lifesequencing S.L. (Life Sequencing, Paterna, Spain) or at the facilities of the Parque Científico de Madrid (Spain) using a pyrosequencing approach implemented in the 454 Life Science/Roche platform.

Taxonomic assignment was done using the MG7 program developed by Era7 Bioinformatics,<sup>28</sup> which uses cloud computing for the parallel massive Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) similarity analysis to infer both function and taxonomic assignment. A special peculiarity of the MG7 program is the use of a graph nonrelational database model. MG7 makes use of the Neo4j database to store the results of the analysis and facilitate the querying and the access to data. MG7 taxonomic assignment was done based on 2 different paradigms: Best Blast Hit (BBH) and Lowest Common Ancestor (LCA). In the first case, the assignment of each read was made to the organism that corresponds to the BBH obtained after searching the *nt* database (NCBI), whereas LCA did it to the lowest node in the taxonomic tree that is an ancestor of the top 10 BBHs. Once the similarity data were obtained, the results were organized in the graph database. Considering the presence of large metagenomic datasets with nonspecific taxonomic assignment in the *nt* database, assignment based on BBH was considered to be more specific and informative than that based on LCA.

The dataset obtained in this work is available in the European Nucleotide Archive repository, under the study accession number: PRJEB5976.

### Shannon-Weaver Diversity Index

In this study, the richness and diversity of the human milk bacteriome from healthy and mastitis-suffering women were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index (SDI). A diversity index is a mathematical measure of species diversity in a community. Diversity indices provide more information about community composition than simply species richness (ie, the number of species present) since they also take into account the relative abundance (rarity and commonness) of different species.

## Results

### Milk Cultures

The bacterial concentration in the samples provided by the 10 healthy women oscillated between 2.24 and 2.62 log<sub>10</sub> colony forming units [CFU]/mL. In contrast, high concentrations of *Staphylococcus aureus* (5.3-6.0 log<sub>10</sub> CFU/mL) were found in the samples from acute mastitis (M1-M5) whereas high concentrations of *Staphylococcus epidermidis* (5.0-6.0 log<sub>10</sub> CFU/mL) were obtained in those from subacute mastitis

(M6-M10). Neither Gram-negative bacteria nor yeasts could be isolated from any of the tested samples.

### Pyrosequencing and General Taxonomic Assignment

Mean sequence length of the reads oscillated between 295 and 354 nt. Human DNA content of all the samples was ≥ 90% of the total. In the first phase of the analysis, all reads were compared against the *nt* database by performing a BLAST search. The reads with some hit with an E-value less than 10<sup>-10</sup> were assigned to a taxon. Then, these assignments were filtered and only those based on hits with more than 90% of identity involving more than 80% of the read length remained in the final set. In a second phase of the analysis, reads assigned to the taxa with IDs 10239 (viruses), 12884 (viroids), 2 (Bacteria), 2157 (Archaea), 5204 (Basidiomycota), 4890 (Ascomycota), 33630 (Alveolata), 554915 (Amoebozoa), 207245 (Formicata), 36549 (plasmids), and 2387 (transposons) were selected. The relative abundance of nonhuman sequences associated with each domain is summarized in Table 1. Those sequences that did not map for bacteria, fungi, protozoa, or viruses were removed from further analysis (data not shown). The diversity of the microbial communities was assessed using the SDI and ranged from 1.56 in sample M4 to 3.07 in sample H8 (Table 1). There was a significant loss of microbial diversity in the samples of women with acute or subacute mastitis when compared to those collected from healthy women.

### Taxonomic Assignment of the Bacterial Sequences

A total of 47 481 bacterial reads, representing 12 taxonomic phyla and 275 species, were obtained. As a mean, 24% of the reads (ranging from 4% in sample H1 to 48% in sample H2) were classified as uncultured bacteria. The number of different bacterial DNA species detected in the samples varied from 22 in M1 to 153 in H1. Globally, the 3 most predominant phyla (> 10%) were *Proteobacteria*, *Firmicutes*, and *Bacteroidetes*. Reads belonging to the phyla *Actinobacteria*, *Tenericutes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Deinococcus-Thermus*, *Fibrobacteres*, *Cyanobacteria*, *Chlorobi*, and *Acidobacteria* were scarce.

Samples from healthy women could be divided into 3 different groups (H1-H5; H6-H8; H9-H10) on the basis of their bacterial profiles. In samples H1 to H5, Class *Gammaproteobacteria* was dominant on the basis of the number of reads (20.05%-50.32%), followed by *Alphaproteobacteria* (17.66%-34.87%) (Table 2). The most abundant genus in these 5 samples was *Pseudomonas* (17.67%-49.16%; *Gammaproteobacteria*), followed by *Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*, or *Sphingopyxis* (*Alphaproteobacteria*) (Figure 1); in addition, the predominant species were very similar among

**Table 1.** Microbial Domains<sup>a</sup> Detected in the Human Milk Samples and Their Shannon-Weaver Diversity Indexes.

Sample <sup>b</sup>	SDI	Bacteria	Archaea	Virus	Eukaryota	Unclassified Sequence
H1	2.75	98.33	0.23	0.75	0.69	—
H2	2.92	94.27	0.00	1.67	4.05	—
H3	2.77	97.64	0.00	0.81	1.55	—
H4	2.83	98.01	0.14	1.38	0.47	—
H5	2.97	96.29	0.07	0.92	2.72	—
H6	3.04	97.66	0.03	1.03	1.25	0.03
H7	2.86	96.07	0.05	0.97	1.81	—
H8	3.07	95.24	0.09	1.10	3.52	0.05
H9	2.62	94.75	0.19	2.06	3.00	—
H10	2.81	95.15	0.23	2.17	2.45	—
M1	1.60	91.53	0.00	7.75	0.72	—
M2	1.64	91.20	0.00	7.49	1.31	—
M3	1.71	92.50	0.00	6.88	0.62	—
M4	1.56	91.47	0.00	7.34	1.19	—
M5	1.60	92.01	0.00	6.71	1.28	—
M6	2.64	95.00	0.00	2.39	2.61	—
M7	1.86	93.83	0.00	2.97	3.20	—
M8	1.72	94.28	0.00	3.92	1.80	—
M9	2.33	93.92	0.00	3.28	2.70	—
M10	2.29	94.12	0.00	3.73	2.15	—

Abbreviations: SDI, Shannon-Weaver diversity index; —, not detected.

<sup>a</sup>The results are expressed as the percentage of the total reads different from human reads.<sup>b</sup>H1-H10, healthy women; M1-M5 and M6-M10, women suffering from acute and subacute mastitis, respectively.

these 5 samples, although there was an interindividual variability in relation to the less abundant species. The species profile of samples H6, H7, and H8 differed notably from that of the previous 5 samples since Class *Bacteroidia* (21.03%-22.95%), represented by the genera *Bacteroides* and *Parabacteroides*, was dominant, followed by Class *Gammaproteobacteria* (18.79%-22.43%) and Class *Clostridia* (16.00%-20.91%), which included the genera *Eubacterium*, *Roseburia*, *Faecalibacterium*, and *Ruminococcus* (Figure 1). Globally, the profiles of samples H9 and H10 were similar to those of H1 to H5 at the genera level, although the percentages of the reads corresponding to the phyla *Firmicutes*, *Actinobacteria*, and *Tenericutes* and the abundance of some genera belonging to class *Bacilli*, such as *Streptococcus*, were higher in H9 and H10 (Figure 1).

Class *Bacilli* (69.08%-74.07%) and Genus *Staphylococcus* (62.53%-70.97%) clearly predominated in the samples from acute mastitis cases (M1-M5) (Table 2; Figure 1). Moreover, they were the samples displaying the lowest diversity and, in fact, between 60.9% and 67.2% of the reads belonged to the species responsible for the mastitis (*S aureus*).

Among the samples (M6-M10) obtained from women with subacute mastitis, 3 classes were dominant: *Bacilli* (10.00%-35.07%), *Gammaproteobacteria* (17.15%-32.39%), and *Alphaproteobacteria* (12.03%-25.43%) (Table 2). The Genus *Staphylococcus* and the species *S epidermidis*, which probably was the species responsible for the mastitis as assessed by the milk cultures, accounted for 8.26% to

23.55% and 7.6% to 21.5%, respectively, of the reads obtained from these samples (Figure 1).

The genera *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis*, *Sphingobium*, and *Burkholderia* were present in at least 8 of the 10 samples from healthy women (Figure 1). In contrast, there was a notable decrease in the percentage of samples containing DNA from the genera *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Propionibacterium* among the samples provided by women suffering from mastitis (Figure 1).

### Taxonomic Assignment of Eukaryotic Microorganisms, Archaeal, and Viral Related Sequences

Sequences from fungal, protozoan, archaeal, and viral organisms were also detected and identified in the samples (Table 1). Fungal reads belonging to the phyla *Basidiomycota* and *Ascomycota* were found in all the samples (0.23%-1.15% of the total reads), with the exceptions of M1, M5, and M8. The number of fungal species detected in each positive sample ranged between 1 and 5. Samples H3 (*Calocera cornea*, *Guepiniopsis buccina*, *Malassezia globosa*, *Podospora anserina*, *Sordaria macrospora*) and H4 (*Candida dubliniensis*, *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*, *Talaromyces stipitatus*, *Yarrowia lipolytica*) had



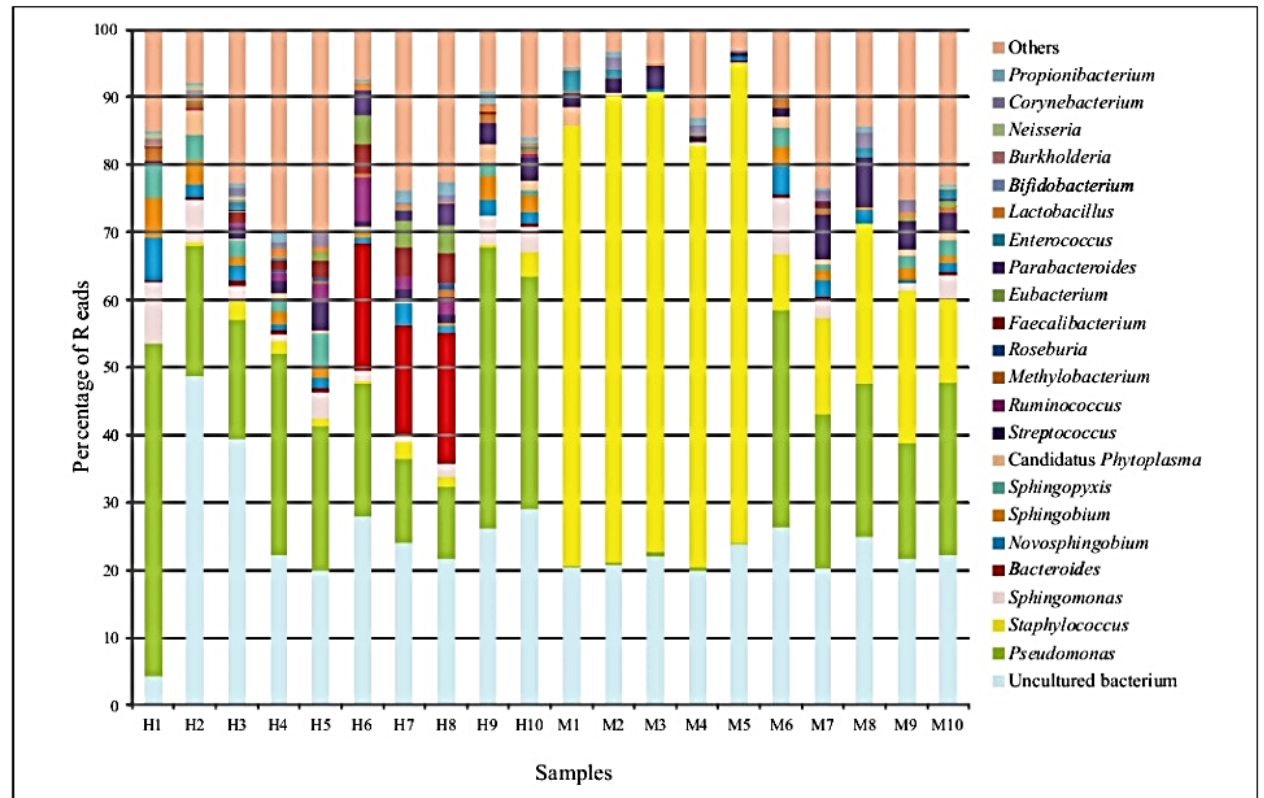
**Table 2.** Number of Reads and Percentage of the Main Bacterial Classes Detected in Milk Samples.

Sample <sup>a</sup>	Reads	Gammap.	Alphap.	Bacilli	Bacteroidia	Clostridia	Betaprot.	Actinobact.
H1	3896	50.32	34.87	0.17	0.17	0.17	5.53	1.44
H2	606	20.05	17.66	1.19	0.48	0.48	2.39	0.72
H3	2715	36.15	27.73	2.16	0.52	0.39	3.44	1.67
H4	2823	38.23	19.92	3.14	0.29	0.63	0.63	4.14
H5	2929	44.21	30.01	1.02	0.66	0.22	0.22	3.78
H6	4725	20.06	5.52	2.10	22.95	20.91	0.56	2.30
H7	3415	18.79	7.24	2.75	24.68	17.31	0.72	3.29
H8	3707	22.43	6.40	3.03	21.03	16.00	0.41	2.11
H9	764	42.40	15.38	4.32	0.00	0.94	1.88	2.06
H10	2992	39.15	17.16	2.71	0.14	1.16	1.57	2.81
M1	615	1.69	0.48	71.19	0.00	0.00	0.00	0.24
M2	1723	1.07	0.41	70.07	0.00	0.07	0.00	0.34
M3	1903	1.32	0.53	69.08	0.00	0.11	0.00	0.46
M4	2224	0.73	0.21	74.07	0.00	0.00	0.00	0.00
M5	2001	0.81	0.32	73.69	0.00	0.00	0.00	0.21
M6	761	32.39	25.43	10.00	0.22	0.00	0.43	1.30
M7	2364	27.93	19.07	24.13	0.29	1.29	0.51	0.92
M8	2496	18.21	12.03	35.07	0.14	0.00	0.00	0.12
M9	2012	25.28	16.74	23.06	0.31	0.98	0.37	1.11
M10	2810	17.15	20.01	31.12	0.17	0.12	0.00	0.45

Abbreviations: Actinobact., Actinobacteria; Alphap., Alphaproteobacteria; Betaprot., Betaproteobacteria; Gammap., Gammaproteobacteria.

<sup>a</sup>H1-H10, healthy women; M1-M5 and M6-M10, women suffering from acute and subacute mastitis, respectively.

**Figure 1.** Genera Detected in the Human Milk Samples Analyzed in this Study.



H1-H10, healthy women; M1-M5, women suffering from acute mastitis; M6-M10, women suffering from subacute mastitis.



**Table 3.** Main Eukaryotic Microorganisms<sup>a</sup> Detected in the Human Milk Samples.<sup>b</sup>

Microorganism	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
<i>Dictyostelium discoideum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.5	—	—	—	—	—	—	0.3	—	—
<i>Dictyostelium purpureum</i>	—	0.2	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	—	—	—	—
<i>Giardia intestinalis</i>	—	—	—	—	—	0.03	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Toxoplasma gondii</i>	0.3	2.6	—	—	—	0.4	—	—	1.3	1.0	—	—	—	0.3	—	1.1	—	—	—	—
<i>Paramecium tetraurelia</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	—	0.4	—	—
Uncultured eukaryote	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.4	—	—	0.2	—

Abbreviation: —, not detected.

<sup>a</sup>The results are expressed as the percentage of the total reads.<sup>b</sup>H1-H10, healthy women; M1-M5 and M6-M10, women suffering from acute and subacute mastitis, respectively.**Table 4.** Viral Sequences<sup>a</sup> Detected in the Human Milk Samples.<sup>b</sup>

Microorganism	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
<i>Betapapillomavirus</i>	—	0.2	—	—	—	—	—	—	0.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Cytomegalovirus</i>	0.5	—	—	—	0.7	—	—	—	—	—	2.4	—	—	—	—	0.2	—	—	—	—
Human endogenous retroviruses	0.06	0.7	0.3	0.9	0.4	0.03	0.09	0.2	1.7	1.2	3.6	3.2	2.4	3.1	1.9	2.2	2.0	2.6	1.8	1.5
<i>Lentivirus</i>	0.2	0.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Simplexvirus</i>	—	0.2	—	—	—	—	—	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	—
<i>Staphylococcus</i> phage ( <i>Siphoviridae</i> )	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.7	1.9	2.1	1.4	1.5	—	—	0.5	—	0.4
Unclassified viruses	—	—	—	—	—	—	—	—	0.2	0.3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Abbreviation: —, not detected.

<sup>a</sup>The results are expressed as the percentage of the total reads.<sup>b</sup>H1-H10, healthy women; M1-M5 and M6-M10, women suffering from acute and subacute mastitis, respectively.

the highest fungal diversity with 5 different species each. The species *M. globosa* was detected in all the positive samples with the exception of those provided by women with mastitis. The yeast *Candida albicans* could not be detected in any sample.

Despite the absence of any clinical symptoms of infestation, reads belonging to some protozoal parasites were detected. *Toxoplasma gondii* was detected in 7 milk samples (35% of the total samples), whereas *G. intestinalis* could be detected in only 1 (H6). Other eukaryotic microorganisms were also detected but their abundance was lower (Table 3).

Archaeal DNA was detected in 8 samples, all of them provided by healthy women (Table 1). The species *Haloarcula marismortui* was identified in samples H5, H6, and H10; *Halorhabdus utahensis* in samples H4 and H7; and both of them, together with *Halomicrobium mukohataei*, were identified in samples H1, H8, and H9.

Viral reads were also detected in all human milk samples studied and were associated with families *Papillomaviridae*, *Retroviridae*, *Siphoviridae*, and *Herpesviridae* (Table 4). Four samples (20%) contained reads associated with *Cytomegalovirus*. It is interesting that some of the viral sequences detected in M1 to M5 samples were associated with phages that are related to the pathogenicity of *S. aureus*. Human endogenous retroviruses were identified in all the samples and their presence oscillated from 0.06% in H1 to 3.63% in M1 (Table 4).

## Discussion

The results of this work indicate that human milk contains a complex microbial metagenome constituted not only from the genome of bacteria but also from that of archaea, viruses, fungi, and protozoa. In addition, they show that the composition of the milk microbiome differs depending on the mammary health status of the recruited women.

Total DNA was extracted and sequenced using 454 pyrosequencing with a shotgun strategy. This type of technology avoids the biases introduced by the use of primers when amplifying different 16S rRNA gene hypervariable regions.<sup>29-32</sup> A metagenomic analysis of human milk has been published previously, but it was performed from a pooled milk sample (10 donors) and used to determine the genera of bacteria, the types of bacterial open reading frames that may influence bacterial establishment and stability in human milk, and potential immune-modulatory bacterial-DNA motifs.<sup>18</sup> Therefore, this is the first metagenomic analysis, to our knowledge, taking into account not only bacteria but the whole microbiome of human milk, providing a broader view of the ecology of milk microorganisms by including not only bacteria but also fungi, protozoa, archaea, and viruses. The ratio of human DNA: microbial DNA was approximately 9:1 in all the samples. Although the bacterial counts in the samples from women suffering from mastitis were ~2.5 log<sub>10</sub> cycles higher than in the rest of the samples,

the concentration of epithelial cells and leukocytes also increased in a directly proportional manner.

Among bacteria, the phylum *Proteobacteria* was predominant in most samples; this is in contrast to previous human milk bacteriome studies where *Firmicutes* were more abundant<sup>8,17</sup> but in agreement with the metagenome study cited above.<sup>18</sup> The use of different high-throughput sequencing techniques (shotgun versus 16S rRNA amplification) may explain such divergences.<sup>2</sup> In fact, it has been shown that phylum profiles may vary in the same sample depending on the 16S rRNA hypervariable target region.<sup>30</sup>

Shannon-Weaver diversity indices revealed a high inter-individual variability in the composition of the microbiome at the species level; however, a bacterial core microbiome (*Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis*, *Sphingobium*, and *Burkholderia*) could be detected in the samples obtained from healthy women. In addition to the predominance of facultative anaerobes, such as *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, and *Propionibacterium*,<sup>8</sup> significant populations of obligate anaerobes, including *Bifidobacterium*, were detected. This study also revealed the presence of DNA of several major gut-associated obligate anaerobes, such as *Bacteroides* and butyrate-producing species (*Roseburia* sp., *E. rectale*, *F. prausnitzii*), which are important for colonic health. Such results confirm those reported previously by Jost et al<sup>19</sup> and support the existence of a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation.<sup>33,34</sup>

Staphylococci, streptococci, lactobacilli, and propionibacteria have been isolated in numerous culture-dependent studies on the bacterial diversity of human milk.<sup>5</sup> In contrast, Gram-negative bacteria have been seldom isolated from human milk even though many of them, including *Pseudomonas* and closely related bacteria, grow well in standard laboratory conditions. In fact, no bacteria belonging to the genera *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis*, or *Sphingobium* could be isolated from any of the tested samples. The abundant presence of DNA sequences related to such genera in milk samples might arise from the conventional DNA-extraction kits and other lab reagents, since it is well established that they may contain DNA from such microorganisms.<sup>35,36</sup> Therefore, when sampling low microbial biomass samples, such as those of human milk, it should be absolutely imperative to sequence a blank control. Otherwise, there can be a significant error in the microorganisms considered among the core microbiome. As a consequence, it is highly probable that the core bacteriome of the analyzed samples is actually constituted by *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, and gut-associated obligate anaerobes (*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*). This is an important aspect that must be addressed in future studies dealing with

the assessment of the human milk microbiome or metagenome. Meanwhile, results provided without a blank control, such as those obtained in this and previous milk microbiome studies, should be analyzed with caution.

The genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* were rarely encountered in previous 16S rRNA amplification studies focused on human milk.<sup>8,17,18</sup> In this study, *Lactobacillus*-related reads were detected in most of the samples and, in fact, this genus could be included in the bacterial core microbiome. Two different *Bifidobacterium* species (*B. longum* and *B. breve*) could also be detected in some different samples although at a lower frequency. Culture-dependent and -independent methods have previously described the detection and/or isolation of bifidobacteria from human milk.<sup>12,13,37,38</sup> The fact that bifidobacteria sequences were so scarce may be attributable to genetic, environmental, or dietary differences among subjects. In addition, differences in the high-throughput sequencing techniques used may be responsible for these conflicting findings.<sup>2</sup> In this context, a metagenomic analysis of the development of the infant gut microbiota found a relatively low frequency and low abundance of bifidobacteria in the fecal microbiota at any age from birth to adulthood.<sup>39</sup> In contrast, an assessment of the complexity of the infant intestinal bifidobacterial population by analysis of pyrosequencing data of PCR amplicons suggested a predominance of bifidobacteria in the infant gut as well as a profile of co-occurrence of bifidobacterial species in the infant intestine.<sup>40</sup>

Mastitis is a common disease during lactation since it has an incidence of up to 33% of lactating mothers and represents 1 of the main medical causes of precocious weaning.<sup>41,42</sup> This inflammation of 1 or more lobules of the mammary gland usually has an infectious origin, involving staphylococci, streptococci, or corynebacteria.<sup>27,41,43</sup> *Saureus* is the main etiological agent of acute mastitis, an acute inflammation of the breast accompanied by systemic signs.<sup>27,44-46</sup> On the other hand, coagulase-negative staphylococci and some streptococcal species are usually involved in subacute and chronic cases,<sup>27,47-49</sup> which are characterized by breast pain often in the absence of external breast signs (such as redness) and systemic symptoms. The results of this study clearly show the strong effect of the pathogen responsible for acute mastitis (*S. aureus*); in fact, its presence was associated with a drastic reduction of the microbial diversity of samples M1 to M5, which displayed the lowest Shannon-Weaver diversity index among the samples included in this work. This effect was lower but still noticeable in the samples provided by the women who suffered from subacute mastitis (M6-M10).

The complete genome analysis of some methicillin-resistant *S. aureus* and *S. epidermidis* strains of human origin has revealed the propensity of *S. aureus* to cause fulminant and sometimes life-threatening infections, as opposed to the predisposition of *S. epidermidis* for chronic and recurrent infections.<sup>50</sup> *S. aureus* is characterized by its adaptability to diverse



and hostile environments, a process in which phages usually play an essential role.<sup>51</sup> Phages encode many *S aureus* virulence factors and provide the pathogen with a large variety of toxins and mechanisms to evade the response of the host's immune system.<sup>51</sup> Therefore, it is not strange that samples M1 to M5 were associated with the highest abundance of phage-related sequences. It should be highlighted that this study has shown that human milk microbiome varies depending on the health status of the mother (healthy women vs women with mastitis). Recently, it has been reported that antibiotherapy is associated with decreased lactobacilli and bifidobacteria populations in human milk,<sup>52</sup> whereas chemotherapy caused a significant deviation from a healthy microbial and metabolomic profile, with depletion of genera *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Staphylococcus*, and *Cloacibacterium*.<sup>53</sup>

At present, most of our knowledge on the human microbiome is related to bacteria. However, other microorganisms, such as protozoa, fungi, or viruses, also play important roles in human health and disease and interact actively with bacteria.<sup>3</sup> Presence of fungal, nematodal, and viral DNA in the gut microbiome of preterm and term infants has already been evidenced by high-throughput sequencing, and human milk has been suggested as 1 of the potential vehicles for mother-to-infant transmission.<sup>54,55</sup> In relation to fungal sequences, our results showed a narrow spectrum of species in the samples where they were detected. It is interesting that *Malassezia*-associated DNA was found in all the samples with the exception of those from women suffering from mastitis. Presence of the genus *Malassezia* has been reported in cow's, goat's, and ewe's milk,<sup>56</sup> but it had never been reported in human milk previously. In this study, *Candida* spp. could not be isolated from any sample, and similarly, no DNA sequence related to the genus *Candida* could be detected among the analyzed samples, despite the fact that some subacute mastitis cases were initially misdiagnosed by midwives as "fungal mastitis" or "mammary candidiasis" on the basis of a mere visual assessment of the breast. Absence of *Candida* spp. in samples from women diagnosed as suffering from ductal candidiasis has already been reported<sup>57</sup>; this highlights the need from microbial cultures for a correct diagnosis of the etiological agents involved in mastitis.

In this study, reads associated with *T gondii* could be detected in 7 (35%) samples; this result is not rare since toxoplasmosis is the most prevalent infection in humans, infecting 30% to 50% of the world human population,<sup>58</sup> with a prevalence of 32% among women of reproductive age in Spain.<sup>59</sup> None of the women who provided the *T gondii*-positive samples showed any sign of infestation, probably due to their good immunological condition and nutritional status of the women who participated in this study.

It is well known that human milk can be a vehicle for vertical transmission of certain viruses, including human immunodeficiency virus (HIV), cytomegalovirus, human T cell leukemia virus (HTLV), and other viruses.<sup>60-62</sup> In some instances, they can infect infants and cause disease, although,

in most of the cases, other milk components seem to protect them from getting infected despite repeated viral exposure through breastfeeding.<sup>63-65</sup> All the volunteers who participated in our study were negative for HIV-1, HIV-2, and HTLV. However, viruses may greatly contribute to shape the human milk microbiota and microbiome as shown in the sample provided by the woman who suffered acute mastitis caused by *S aureus*. Finally, endogenous retroviruses have invaded the germ cell lines of every species of vertebrate, a fact that has important evolutionary, physiological, and pathological implications.<sup>66</sup> Therefore, their presence in human milk and their potential physiological or pathological roles deserve future research.

## Conclusion

In conclusion, the results of this study indicate that human milk contains a complex metagenome constituted by the genome of human epithelial and immune cells together with those provided by bacteria, archaea, viruses, fungi, and protozoa. Although it is obvious that the number of women in each cohort is too small to draw scientifically relevant conclusions and that further work on larger groups of women should be done, some relevant differences have been observed in the human milk microbiome depending on the women's health status. In addition, the results of this study highlight the need to include blank controls in microbiome and metagenome studies of human milk samples to avoid important errors in the recognition of a "core human milk microbiome." Finally, this study should stimulate future research on the presence and roles of endogenous retroviruses in the lactating breast and in human milk.

## Declaration of Conflicting Interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## Funding

The authors disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This study was supported by AGL2013-41980-P project from the Ministry of Economy and Competitiveness, Spain.

## References

1. Aagaard K, Riehle K, Ma J, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 2012;7(6):e36466.
2. Lagier JC, Million M, Hugon P, Amougoum F, Raoult D. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:136.
3. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012;148(6):1258-1270.
4. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 2012;13(4):260-270.

5. Fernández L, Langa S, Martín V, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):1-10.
6. Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes.* 2013;4(1):17-30.
7. Hunt KM, Preuss J, Nissan C, et al. Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(14):4763-4770.
8. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, et al. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One.* 2011;6(6):e21313.
9. Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol.* 2003;95(3):471-478.
10. Martín R, Langa S, Reviriego C, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* 2003;143(6):754-758.
11. Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, et al. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol.* 2008;8:143.
12. Martín V, Maldonado-Barragán A, Moles L, et al. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *J Hum Lact.* 2012;28(1):36-44.
13. Martín R, Jiménez E, Heilig HG, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(4):965-969.
14. Albesharat R, Ehrmann MA, Korakli M, Yazaji S, Vogel RF. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34(2):148-155.
15. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women. *Res Microbiol.* 2007;158(1):31-37.
16. Pérez PF, Doré J, Leclerc M, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics.* 2007;119(3):e724-e732.
17. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr.* 2012;96(3):544-551.
18. Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiol.* 2013;13:116.
19. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr.* 2013;110(7):1253-1262.
20. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010;464(7285):59-65.
21. Nasidze I, Li J, Quinque D, Tang K, Stoneking M. Global diversity in the human salivary microbiome. *Genome Res.* 2009;19(4):636-643.
22. Belda-Ferré P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, et al. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 2012;6(1):46-56.
23. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(suppl 1):4680-4687.
24. Smith BC, McAndrew T, Chen Z, et al. The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization. *PLoS One.* 2012;7(7):e40425.
25. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science.* 2009;326(5960):1694-1697.
26. Grice EA, Kong HH, Conlan S, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science.* 2009;324(5931):1190-1192.
27. Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marín M, Jiménez E, Rodríguez JM. Probiotics for human lactational mastitis. *Benef Microbes.* 2014;5(2):169-183.
28. Pareja-Tobes P, Manrique M, Pareja-Tobes E, Pareja E, Tobes R. BG7: a new approach for bacterial genome annotation designed for next generation sequencing data. *PLoS One.* 2012;7(11):e49239.
29. Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One.* 2009;4(10):e7401.
30. Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(22):e200.
31. Mao DP, Zhou Q, Chen CY, Quan ZX. Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets. *BMC Microbiol.* 2012;12:66.
32. Sim K, Cox MJ, Wopereis H, et al. Improved detection of bifidobacteria with optimised 16S rRNA-gene based pyrosequencing. *PLoS One.* 2012;7(3):e32543.
33. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol.* 2014;16(9):2891-2904.
34. Rodríguez JM. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr.* 2014;5(6):779-784.
35. Tanner MA, Goebel BM, Dojka MA, Pace NR. Specific ribosomal DNA sequences from diverse environmental settings correlate with experimental contaminants. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(8):3110-3113.
36. Barton HA, Taylor NM, Lubbers BR, Pemberton AC. DNA extraction from low-biomass carbonate rock: an improved method with reduced contamination and the low-biomass contaminant database. *J Microbiol Methods.* 2006;66(1):21-31.
37. Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation. *Neonatology.* 2007;92(1):64-66.
38. Solís G, de los Reyes-Gavilán CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe.* 2010;16(3):307-310.
39. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLOS Biol.* 2007;5(7):e177.
40. Turróni F, Peano C, Pass DA, et al. Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One.* 2012;7(5):e36957.
41. World Health Organization. *Mastitis: Causes and Management.* Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2000.
42. Foxman B, D'Arcy H, Gillespie B, Bobo JK, Schwartz K. Lactation mastitis: occurrence and medical management among



- 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol*. 2002;155(2):103-114.
43. Lawrence RA, Lawrence RM. *Breastfeeding. A Guide for the Medical Profession*. 6th ed. St Louis, MO: Elsevier Mosby; 2005.
44. Thomsen AC, Hansen KB, Moller BR. Leukocyte counts and microbiologic cultivation in the diagnosis of puerperal mastitis. *Am J Obstet Gynecol*. 1983;146(8):938-941.
45. Riordan JM, Nichols FH. A descriptive study of lactation mastitis in long-term breastfeeding women. *J Hum Lact*. 1990;6(2):53-58.
46. Stafford I, Hernández J, Laibl V, Sheffield J, Roberts S, Wendel G. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with puerperal mastitis requiring hospitalization. *Obstet Gynecol*. 2008;112(3):533-537.
47. Thomsen AC, Mogensen SC, Love Jepsen F. Experimental mastitis in mice induced by coagulase-negative staphylococci isolated from cases of mastitis in nursing women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1985;64(2):163-166.
48. Delgado S, Arroyo R, Martín R, Rodríguez JM. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infect Dis*. 2008;8:51.
49. Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, et al. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiol*. 2009;9:82.
50. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*. 2005;187(7):2426-2438.
51. Deghorain M, Van Melder L. The staphylococci phages family: an overview. *Viruses*. 2012;4(12):3316-3335.
52. Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014;59(1):78-88.
53. Urbaniak C, McMillan A, Angelini M, et al. Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome*. 2014;2:24.
54. Breitbart M, Haynes M, Kelley S, et al. Viral diversity and dynamics in an infant gut. *Res Microbiol*. 2008;159(5):367-373.
55. LaTuga MS, Ellis JC, Cotton CM, et al. Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PLoS One*. 2011;6(12):e27858.
56. Delavenne E, Mounier J, Asmani K, Jany JL, Barbier G, Le Blay G. Fungal diversity in cow, goat and ewe milk. *Int J Food Microbiol*. 2011;151(2):247-251.
57. Hale TW, Bateman TL, Finkelman MA, Berens PD. The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. *Breastfeed Med*. 2009;4(2):57-61.
58. Flegr J, Prandota J, Sovičková M, Israili ZH. Toxoplasmosis—a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One*. 2014;9(3):e90203.
59. Muñoz Batet C, Guardia Llobet C, Juncosa Morros T, et al. Toxoplasmosis and pregnancy. Multicenter study of 16,362 pregnant women in Barcelona. *Med Clin*. 2004;123(1):12-16.
60. Stagno S, Cloud GA. Working parents: the impact of day care and breast-feeding on cytomegalovirus infections in offspring. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(7):2384-2389.
61. Sarkola M, Funtala M, Grenman S, Syganen S. Human papillomavirus DNA detected in breast milk. *Ped Inf Dis J*. 2008;27(6):557-558.
62. Glenn WK, Whitaker NJ, Lawson JS. High risk human papillomavirus and Epstein Barr virus in human breast milk. *BMC Res Notes*. 2012;5:477.
63. Kuhn L. Milk mysteries: why are women who exclusively breast-feed less likely to transmit HIV during breast-feeding? *Clin Infect Dis*. 2010;50(5):770-772.
64. Martín V, Maldonado A, Fernández L, Rodríguez JM, Connor RI. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by lactic acid bacteria from human breast milk. *Breastfeed Med*. 2010;5(4):153-158.
65. Wahl A, Swanson MD, Nochi T, et al. Human breast milk and antiretrovirals dramatically reduce oral HIV-1 transmission in BLT humanized mice. *PLoS Pathog*. 2012;8(6):e1002732.
66. Ryan FP. Human endogenous retroviruses in health and disease: a symbiotic perspective. *J R Soc Med*. 2004;97(12):560-565.

IV.2. Milk and blood biomarkers associated to the clinical efficacy of a probiotic for the treatment of infectious mastitis

Espinosa-Martos I, Jiménez E, de Andrés J, Rodríguez-Alcalá LM, Tavárez S, Manzano S, Fernández L, Alonso E, Fontecha J, Rodríguez JM.

Benef Microbes. 2016 Jun;7(3):305-18. doi: 10.3920/BM2015.0134. Epub 2016 Mar 1.



## Milk and blood biomarkers associated to the clinical efficacy of a probiotic for the treatment of infectious mastitis

I. Espinosa-Martos<sup>1,2</sup>, E. Jiménez<sup>1,2</sup>, J. de Andrés<sup>1</sup>, L.M. Rodríguez-Alcalá<sup>3</sup>, S. Tavárez<sup>4</sup>, S. Manzano<sup>2</sup>, L. Fernández<sup>1,2</sup>, E. Alonso<sup>4</sup>, J. Fontecha<sup>3</sup> and J.M. Rodríguez<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutrition, Food Science and Food Technology, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain; <sup>2</sup>Probisearch, C/Santiago Grisolia 2, 28760 Tres Cantos, Spain; <sup>3</sup>Institute of Food Science Research (CIAL), CSIC-UAM, C/Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain; <sup>4</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Valencia, Av. Doctor Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain; [jmrodrig@ucm.es](mailto:jmrodrig@ucm.es)

Received: 13 September 2015 / Accepted: 20 December 2015

© 2016 Wageningen Academic Publishers

## RESEARCH ARTICLE

### Abstract

Previous studies have shown the efficacy of oral administration of selected lactobacilli strains to treat mastitis. The objective of this study was to find microbiological, biochemical and/or immunological biomarkers of the probiotic effect. Women with (n=23) and without (n=8) symptoms of mastitis received three daily doses (10<sup>9</sup> cfu) of *Lactobacillus salivarius* PS2 for 21 days. Samples of milk, blood and urine were collected before and after the probiotic intervention, and screened for a wide spectrum of microbiological, biochemical and immunological parameters. In the mastitis group, *L. salivarius* PS2 intake led to a reduction in milk bacterial counts, milk and blood leukocyte counts and interleukin (IL)-8 level in milk, an increase in those of immunoglobulin (Ig)E, IgG3, epidermal growth factor and IL-7, a modification of the milk electrolyte profile, and a reduction of some oxidative stress biomarkers. Such biomarkers will be useful in future clinical studies involving a larger cohort.

**Keywords:** mastitis, probiotics, *Lactobacillus salivarius*, milk, blood

### 1. Introduction

The study of the human milk microbiota has revealed a complex ecosystem with implications for both infant and mother health (Fernández *et al.*, 2013). As an example, mammary dysbiosis, which may be triggered by a variety of host, microbial and medical factors, often leads to mastitis (Delgado *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2014). This condition constitutes the first cause of undesired weaning with an incidence among lactating women as high as 35% when any clinical mastitis case is considered (Schoenfeld and McKay, 2010). Given the infant benefits provided by breastfeeding, mastitis should be considered as a relevant Public Health issue.

The main bacterial agents involved in mastitis often display properties that, under certain circumstances, favour their growth in lactating mammary structures, eventually leading to infection (Contreras and Rodríguez, 2011). First,

*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, the main species causing acute and subacute mastitis, respectively, are important nosocomial pathogens, especially in infections of indwelling medical devices. Interestingly, lactating mammary glands contain an extraordinary complex net of ducts, providing an excellent physical support to these microorganisms. Second, lactose and galactose metabolism of *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci is highly efficient through the D-tagatose-6-phosphate pathway (Schleifer *et al.*, 1978). Finally, these bacteria readily metabolise human milk oligosaccharides (Hunt *et al.*, 2012).

Once these agents have caused mastitis, they have additional properties making them difficult to eradicate and, in consequence, complicate the treatment. They may modulate both innate and adaptive immune-responses in hosts, which may contribute to the lack of protective immunity (Frodermann *et al.*, 2011). Recently, it was shown



that *S. aureus* is able to induce multi-dimensional inhibition of adaptive immune-responses through Toll-like receptor signalling (Wang *et al.*, 2012). In addition, mastitis-causing bacteria have the ability to grow forming thick biofilms or granulomas that inhibit major host defence mechanisms and provide them some protection against antimicrobials, often leading to chronic or recurrent infections (Otto, 2013; Paviour *et al.*, 2002). Antibiotic resistance due to mechanisms not related to biofilm formation seems to be a relatively widespread trait among mastitis-causing organisms (Begović *et al.*, 2013; Delgado *et al.*, 2009). Globally, these facts explain why infectious mastitis may be difficult to treat with antibiotics.

In this context, the development of strategies based on the restoration of the mammary microbiota, such as the use of target-specific probiotics, seems an attractive approach for the treatment of this condition. Two clinical trials have already shown that certain lactobacilli strains isolated from human milk constitute an alternative to antibiotics for the treatment of mastitis (Arroyo *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2008). There may be different mechanisms by which some lactobacilli strains are able to control mastitis-causing agents, including competitive exclusion for receptors or nutrients, production of a variety of antimicrobials (such as bacteriocins, organic acids or hydrogen peroxide), or immunomodulation (Fernández *et al.*, 2014). The fact that some lactobacilli strains seem to colonise the mammary gland after oral administration may facilitate the local competition with the bacteria responsible for such condition (Rodríguez, 2014).

The objective of this work was to elucidate if there are microbiological, biochemical or immunological markers in milk, blood or urine that could be specifically associated with the beneficial effect observed during probiotic treatment of mastitis.

## 2. Materials and methods

### Design of the study and collection of the samples

A total of 31 patients participated in the study. Among them, 23 women had clinical symptoms of mastitis (mastitis group) while the remaining 8 women were completely healthy (control group). All the volunteers of the mastitis group met the following criteria: breast inflammation, painful breastfeeding, milk bacterial count  $>3.5 \log_{10}$  cfu/ml, and milk leukocyte count  $>4.5 \log_{10}$  cells/ml. In contrast, healthy volunteers did not show signs of mastitis, and had a milk bacterial count  $<3 \log_{10}$  cfu/ml and a milk leukocyte count  $<4 \log_{10}$  cells/ml. Volunteers did not ingest commercial probiotic supplements during the study. Women with mammary abscesses, Raynaud's syndrome or any other mammary pathology were excluded. All volunteers gave written informed consent to the protocol

(reference 10/017E), which had been approved by the Ethical Committee of Clinical Research of Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). On the basis of results from past clinical trials (Arroyo *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2008; Vázquez-Fresno *et al.*, 2014), the Ethical Committee did not allow a control group of women with mastitis (either left untreated or receiving a placebo). The study was registered in the ClinicalTrials.gov database (NCT01124448).

All volunteers consumed daily, for 21 days,  $\sim 9.5 \log_{10}$  cfu of *Lactobacillus salivarius* PS2. The capsules were manufactured by Biopolis (Valencia, Spain). Mastitis symptoms were assessed at days 0, 7 and 21 by midwives of Primary Health Centers. Milk, blood and urine samples were obtained at the beginning and at the end of the study. Milk samples (30 ml) were collected between 7:00-9:00 and, at least, 2 h after the last feeding. The first 2 ml-fraction was collected in a sterile tube by manual expression using sterile gloves and used for microbiological analysis and somatic cell count. To obtain this 2 ml-fraction, nipples and mammary areola were previously cleaned with soap and sterile water, and soaked in chlorhexidine (Cristalmina; Salvat, Barcelona, Spain), and the first drops ( $\sim 500 \mu\text{l}$ ) were discarded. The rest of the milk sample was obtained using a breast pump and used for biochemical and immunological analyses.

Blood samples were extracted at Unilabs (Madrid, Spain). The first 22 ml-fraction was collected into a Na-heparin tube to analyse the fatty acid (FA) composition of the cellular fraction and oxidative stress (OS)-related parameters in plasma; a second 8 ml-fraction was collected in EDTA tubes for standard haematology and immunological analyses; finally, a 4 ml-fraction was used to obtain serum for standard biochemistry and quantification of the high sensitive C-reactive protein (hs-CRP). First morning urine was collected for standard urinalysis (density, pH, proteins, glucose, ketone bodies, nitrites, urobilinogen, red blood cells and leukocytes). Haematology and biochemical analyses of blood samples and urine analysis were performed by Unilabs.

### Bacterial count and identification in milk samples

Milk samples were spread onto Baird Parker, Columbia Nadilixic Acid, Mac Conkey and Sabouraud Dextrose Chloramphenicol agar plates (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) and incubated for 48 h at 37 °C in aerobic conditions for selective isolation and quantification of the main agents involved in infectious mastitis. After bacterial counting, representatives of each colony morphology type were identified using a MALDI-TOF platform (VITEK MS, BioMerieux) by Probisearch (Tres Cantos, Spain).



### Somatic cell count and analysis

Fresh milk samples were used for somatic cell count (SCC) using an automatic cell counter (DCC, DeLaval, Alcobendas, Spain). Analysis of somatic cells subsets was performed by optical microscopy after May-Grünwald-Giemsa differential staining of fresh milk. The analysis was performed in duplicate by two different observers and  $\geq 100$  cells were counted in each sample.

### Milk macronutrient and electrolyte analysis

Fat, protein, lactose, total solids and non-fat solids concentrations were determined using an instrument (MilkoScan Minor, Foss Iberia, Barcelona, Spain) previously calibrated and validated for human milk analysis. Sodium, potassium and chloride concentrations were determined in defatted milk samples using ion-selective electrodes in a Spotlyte analyser (Menarini Diagnostics Inc., Barcelona, Spain). After thawing, 0.5 ml of each milk sample was spiked with 0.5 ml of 40 mM NaCl solution. Each measure was repeated three times.

### Fatty acid composition of milk and blood cell fraction

FAs present in milk and blood cell fraction were directly derivatised to FA methyl esters (FAME) and analysed as described previously (Rodríguez-Alcalá *et al.*, 2009). The Supelco 37-component FAME mix and NIST MS Database (version 2005) were used for qualitative purposes. Analyses were carried out in duplicate.

### Immunological analysis of milk and blood plasma and determination of Lewis antigens

Concentrations of a wide spectrum of cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins (Igs) in milk and blood samples were determined in duplicate using a Bioplex 200 system instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) or by ELISA as described previously (Espinosa-Martos *et al.*, 2013). Lewis antigens were also analysed in plasma samples.

### Oxidative stress and nitric oxide metabolism products in blood

Metabolites related to OS and nitric oxide metabolism end products (NOx) (listed in Supplementary Table S4) were measured in duplicate as described previously (Codoñer-Franch *et al.*, 2011, 2012).

### Statistical analysis

Assessment of the sample size was based on an estimated large effect size ( $d=0.997$ ) of the probiotic on the total bacterial counts of milk samples, calculated on the basis

of previous results obtained by our lab, with a one-sided test,  $\alpha$  at 0.05 and a statistical power of 95%. The t-test estimated a sample size of 46 subjects to be equally distributed between the two groups ( $n=23/\text{group}$ ). However, since the recruitment of healthy women was slow and our main objective was the effect of the probiotic strain on mastitis, a post-hoc analysis was performed once 23 women of the mastitis group were recruited. This analysis revealed that the power to detect the changes observed in total bacterial counts after the probiotic treatment in 23 cases and 8 controls was 0.82. Simple size calculation and post hoc power analysis were done using G\*Power version 3.1.9.2 (Faul *et al.*, 2007).

Microbiological data, recorded as cfu/ml, were transformed to logarithmic values before statistical analysis. Shapiro-Wilk tests were used for assessing normality. Concentrations were expressed as means and 95% confidence intervals for normally distributed data or as medians and interquartile ranges when they were not. The effect of probiotic intervention was analysed by paired Student t-tests or Wilcoxon signed-rank-tests. One-way ANOVA or Mann-Whitney U tests (when ANOVA precepts were not fulfilled) were carried out to evaluate differences between healthy and mastitis volunteers. Changes in the observed frequencies of analytical parameters were analysed using  $\chi^2$  tests with Yates' correction when required. Differences were considered significant at  $P<0.05$ . Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) and R 2.15.3 (R-project, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) software were used for these analyses.

## 3. Results

### Milk analyses

At day 0, the mean total bacterial count in the milk samples was  $4.08 \log_{10}$  cfu/ml; this concentration decreased significantly at the end of the study ( $3.09 \log_{10}$  cfu/ml;  $P<0.000$ ), and reached a value similar to that of the control group at both the initial and the final sampling times (Table 1). The counts of all the microorganisms isolated at high concentrations from milk of women with mastitis (*S. epidermidis*, *S. aureus*, streptococci, and corynebacteria) also decreased significantly at the end of the study (Table 1). *S. aureus* and corynebacteria could not be detected in the milk samples from the control group. Lactobacilli could not be detected in milk samples collected on day 0 but they were isolated in more than half of the women on day 21. Clinical symptoms notably improved among all women with mastitis at day 7 and disappeared or further improved at the end of the study (data not shown). Globally, the SCC values significantly decreased in the mastitis group after the probiotic treatment ( $P=0.000$ ); in addition, a significant decrease in the percentage of polymorphonuclear (PMN) leukocytes (from 6.11 to 2.62;  $P=0.018$ ) and a decreasing

I. Espinosa-Martos et al.

(but not statistically significant) trend in the percentage of epithelial cells (from 2.63 to 1.83) were observed in this group after the probiotic treatment (Table 1). At the end of the study, the percentage of PMN leukocytes in samples from the mastitis group was similar to that found in the control group (2.62 and 2.50, respectively).

Human milk concentrations of fat, lactose, total solids and non-fat solids did not change throughout the study period in both groups; in contrast (and concomitantly with the reduction of the inflammatory state), the protein content decreased significantly from day 0 to day 21 ( $P=0.036$ ) in the mastitis group (Table 2). Sodium ( $P=0.036$ ) and potassium ( $P=0.000$ ) levels decreased in the control and in the mastitis groups, respectively. Such changes were accompanied by an increase of the chloride concentrations in both groups ( $P=0.000$  and  $P=0.002$ , respectively) after the probiotic intervention (Table 2).

The principal FA found in the milk samples of both groups of volunteers was oleic acid (C18:1 *c*9, 40-42%), followed by palmitic (C16, 15-17%), linoleic (C18:2 *c*9,*c*12, ~11-15%), and lauric (C12, ~7-10%) acids (Supplementary Table S1). No changes were found in FA composition of milk after the probiotic treatment, except for a small increase in the concentration of palmitic acid (1.9%,  $P=0.018$ ) in the mastitis group, and in the levels of lauric and miristic acids (1.6%,  $P=0.003$  and 1.2%,  $P=0.038$ , respectively) in the control group.

IgA, IgG1, IgG3, IgG4, and IgM were the Igs most frequently detected in the milk samples. IgA was detected in all the samples at the highest concentrations and its values were similar in both groups (Table 3). Globally, the concentrations of the immunoglobulins in mastitis samples were higher than those found in control samples although no statistical differences were found. After the probiotic

**Table 1. Bacterial counts ( $\log_{10}$  cfu/ml), somatic cell counts ( $\log_{10}$  cell/ml) and percentage of somatic cell subtypes found in milk samples taken from women of the mastitis and control groups before and after the probiotic intervention.**

	Mastitis group (n=23)			Control group (n=8)			Mastitis vs Control	
	Initial <sup>1</sup> (day 0)	Final <sup>1</sup> (day 21)	P-value <sup>2</sup>	Initial <sup>1</sup> (day 0)	Final <sup>1</sup> (day 21)	P-value <sup>2</sup>	Initial P-value <sup>3</sup>	Final P-value <sup>3</sup>
Bacterial count								
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3.59 (3.33-3.85)	2.83 (2.59-3.06)	0.000	2.62 (2.11-2.93)	2.51 (2.01-2.78)	0.469	0.010	0.676
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.87 (0.33-1.41)	0.22 (-0.13-0.56)	0.002	nd <sup>5</sup>	nd			
<i>Streptococcus</i> sp.	2.99 (2.53-3.46)	1.97 (1.61-2.33)	0.000	1.75 (0.82-2.69)	1.15 (0.08-2.22)	0.297	0.010	0.055
<i>Corynebacterium</i> sp.	0.45 (0.08-0.82)	0.03 (-0.23-0.28)	0.001	nd	nd			
Total bacteria counts	4.08 (3.89-4.28)	3.09 (2.90-3.28)	0.000	2.69 (2.41-2.78)	2.55 (2.12-2.60)	0.228	0.000	0.475
Somatic cell count <sup>4</sup>	5.04 (4.53-5.39)	4.63 (4.26-4.66)	0.000	4.04 (3.43-4.33)	3.97 (3.29-4.29)	0.729	0.000	0.029
Somatic cell subtypes (%)								
Monocytes/macrophages	13.84 (9.90-17.77)	17.49 (11.98-23.00)	0.163	10.68 (4.37-16.98)	12.25 (1.58-22.91)	0.940	0.363	0.960
Lymphocytes	77.36 (72.11-82.61)	77.98 (72.77-83.20)	0.346	83.31 (72.83-93.80)	84.25 (72.46-96.04)	0.616	0.233	0.738
Polymorphonuclear leukocytes	6.11 (4.93-7.28)	2.62 (0.78-4.46)	0.018	3.95 (2.38-5.53)	2.50 (0.91-4.09)	0.742	0.035	0.573
Epithelial cells	2.63 (0.87-4.29)	1.83 (0.63-3.03)	0.102	2.00 (-2.02-6.03)	1.00 (-1.25-3.25)	0.497	0.713	0.363

<sup>1</sup> Results are expressed as mean (95% CI) when data were normally distributed and as median (interquartile ranges) when not.

<sup>2</sup> The paired t-test was used when data were normally distributed and the Wilcoxon paired signed-rank test when not.

<sup>3</sup> The ANOVA test was used when the variable was normally distributed and the Mann-Whitney test when not.

<sup>4</sup> Data were not normally distributed.

<sup>5</sup> nd = not detected.



**Table 2. Macronutrients (g/100 g) and electrolytes (mM) levels in milk samples taken from women of the mastitis and control groups before and after the probiotic intervention.**

	Mastitis group (n=23)			Control group (n=8)			Mastitis vs Control	
	Initial <sup>1</sup> (day 0)	Final <sup>1</sup> (day 21)	P-value <sup>2</sup>	Initial <sup>1</sup> (day 0)	Final <sup>1</sup> (day 21)	P-value <sup>2</sup>	Initial P-value <sup>3</sup>	Final P-value <sup>3</sup>
<b>Macronutrients</b>								
Fat	3.00 (2.39-3.62)	2.91 (2.38-3.45)	0.815	2.79 (1.20-4.37)	2.24 (1.40-3.09)	0.314	0.742	0.204
Protein	1.04 (0.94-1.14)	0.94 (0.84-1.03)	0.036	0.90 (0.66-1.15)	0.79 (0.63-0.95)	0.277	0.200	0.118
Lactose	5.55 (5.47-5.63)	5.58 (5.50-5.65)	0.612	5.53 (5.41-5.64)	5.59 (5.50-5.69)	0.165	0.508	0.819
Total solids	11.76 (11.19-12.33)	11.62 (11.12-12.11)	0.688	11.37 (9.95-12.80)	10.79 (9.93-11.65)	0.210	0.519	0.098
Non-fat solids	8.79 (8.65-8.93)	8.74 (8.60-8.88)	0.517	8.63 (8.42-8.86)	8.61 (8.51-8.72)	0.795	0.259	0.327
<b>Electrolytes</b>								
Sodium (Na <sup>+</sup> )	14.54 (12.34-16.75)	14.16 (12.40-15.93)	0.665	14.56 (12.01-17.11)	12.00 (9.99-14.02)	0.036	0.993	0.163
Potassium (K <sup>+</sup> )	13.77 (13.14-14.41)	12.70 (12.19-13.21)	0.000	13.20 (11.41-14.99)	12.33 (11.32-13.33)	0.130	0.406	0.443
Chloride (Cl <sup>-</sup> )	21.94 (18.14-25.73)	28.40 (23.44-33.36)	0.002	25.17 (21.14-29.21)	36.58 (31.20-41.98)	0.000	0.324	0.062
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ratio	1.08 (0.90-1.25)	1.13 (0.98-1.28)	0.447	1.15 (0.81-1.50)	1.09 (0.97-1.21)	0.157	0.649	0.339

<sup>1</sup> Results are expressed as mean (95% confidence interval).  
<sup>2</sup> Paired t-tests.  
<sup>3</sup> ANOVA tests.

treatment, levels of IgE increased significantly ( $P=0.041$ ) in women with mastitis while those of IgG3 increased in both groups ( $P=0.020$  and  $P=0.034$  for mastitis and control groups, respectively) (Table 3).

Cytokines, chemokines and growth factors were found in milk samples at substantially different frequencies: interleukin (IL)-1 $\beta$ , transforming growth factor (TGF)- $\beta_2$ , growth related oncogene (GRO)- $\alpha$ , IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\beta$ , and epithelial growth factor (EGF) could be detected in more than 75% of the samples, IL-6, IL-7 and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in 50-75%, and the rest of these compounds in less than 50% of them (Supplementary Table S2). Probiotic intake did not modify neither their observed frequencies of detection nor their concentrations, at the 95% significance level except for the GM-CSF which decreased significantly ( $P=0.017$ ) during treatment in control volunteers; however, some differences were found in these compounds when the 90% significance level was considered. Firstly, TGF- $\beta_2$  increased with the treatment

in the control group ( $P=0.059$ ) and, as a consequence, final amounts of TGF- $\beta_2$  were different between both groups. Secondly, initial differences in EGF levels between both groups ( $P=0.085$ ) disappeared at the end of the intervention ( $P=0.509$ ) because of the increases observed in both groups ( $P=0.061$  and  $P=0.060$  for mastitis and controls groups, respectively). Finally, IL-7 also increased in both groups but the change was statistically significant only for the mastitis one ( $P=0.070$ ) (Table 3). Interestingly, the mean concentration of cytokines interferon (IFN)- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12(p70), and tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , and chemokines IL-8, MCP-1 and MIP-1 $\beta$  were lower and their 95% confidence intervals were narrower after the intervention in the mastitis group, although these changes did not reach statistical significance (Table 3). In contrast, this tendency was not observed in the control group (Table 3).

**Table 3. Concentrations of immune compounds in milk samples taken from women of the mastitis and control groups before and after the probiotic intervention.**

Immune compounds <sup>1</sup>	Mastitis group			Control group			Mastitis vs Control	
	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial P-value <sup>4</sup>	Final P-value <sup>4</sup>
Immunoglobulins (mg/l)								
IgA ( $\times 10^3$ )	3.90 (3.31-4.49)	3.77 (3.32-4.20)	0.543	3.60 (2.28-4.93)	4.04 (2.64-5.43)	0.168	0.615	0.585
IgE	0.29 (0.12-0.45)	0.50 (0.27-0.73)	0.041	0.26 (-0.29-0.82)	0.35 (0.17-0.52)	0.326	0.879	0.379
IgG1	52.24 (41.42-63.06)	50.10 (36.66-63.54)	0.788	32.11 (9.75-55.46)	45.69 (25.31-66.07)	0.163	0.074	0.721
IgG2	282.85 (83.89-481.82)	285.93 (109.87-461.98)	0.441	340.70	362.50	-	0.837	0.685
IgG3	17.54 (11.39-23.68)	25.50 (17.61-33.39)	0.020	12.92 (-1.06-26.88)	24.08 (12.37-35.80)	0.034	0.437	0.848
IgG4	427.57 (295.82-559.32)	426.80 (323.42-530.18)	0.261	382.86 (236.90-528.82)	275.90 (-17.46-569.26)	0.937	0.739	0.183
IgM	14.97 (9.49-20.45)	14.30 (9.99-18.61)	0.654	6.36 (3.48-9.24)	9.52 (5.32-13.72)	0.185	0.065	0.223
Innate immunity (ng/l)								
IL-1 $\beta$	40.70 (-38.51-119.90)	14.10 (-10.77-38.98)	0.499	0.63 (-0.10-1.35)	0.59 (0.15-1.04)	0.397	0.601	0.524
IL-6	3.42 (0.82-6.01)	1.64 (0.19-3.10)	0.572	0.90 (-0.37-2.17)	1.93 (-1.55-5.41)	0.387	0.326	0.845
IL-12	2.43 (-2.97-7.84)	0.70 (0.07-1.33)	0.500	0.52 (0.03-1.02)	nd	-	0.305	0.935
IFN- $\gamma$	56.06 (-98.47-210.58)	14.52 (-1.59-30.63)	0.475	nd <sup>5</sup>	2.92 (-15.05-20.90)	-	-	0.101
TNF- $\alpha$	14.25 (-11.44-39.93)	4.03 (2.18-5.89)	0.899	1.80 (1.04-2.56)	1.67 (-1.27-4.63)	0.949	0.345	0.221
Acquired immunity (ng/l)								
IL-2	2.24	0.20		nd	nd			
IL-4	0.76 (-0.47-2.00)	0.49 (-0.05-1.03)	0.210	0.67 (-0.33-1.67)	0.49 (-2.87-3.86)	1.000	0.901	0.981
IL-10	2.39 (-1.24-6.02)	0.90 (0.29-1.51)	0.298	1.80 (-7.35-10.95)	0.98 (-2.64-4.61)		0.802	0.883
IL-13	2.90 (-5.49-11.29)	3.72 (-0.49-7.93)	0.166	0.64 (-3.55-4.83)	1.06 (-5.93-8.05)	0.307	0.437	0.496
IL-17	53.17 (-590.08-696.43)	7.01 (-26.79-40.81)		6.14	nd		0.687	-
TGF- $\beta_2$ ( $\times 10^3$ )	7.86 (4.60-11.13)	8.23 (4.42-12.04)	0.646	7.86 (5.13-10.60)	15.25 (8.40-22.11)	0.059	0.999	0.055
Chemokines (ng/l)								
GRO- $\alpha$	899.78 (419.07-1,380.49)	1,936.48 (398.10-3,473.98)	0.185	420.92 (59.91-781.92)	2,130.08 (-738.59-4,998.74)	0.155	0.228	0.894
IL-8	134.40 (46.94-221.86)	56.73 (31.66-81.81)	0.067	40.75 (14.58-66.92)	96.98 (-0.44-194.40)	0.140	0.207	0.209
MCP-1	165.41 (45.78-285.05)	98.97 (38.39-159.55)	0.288	18.80 (7.25-30.35)	57.02 (1.73-112.32)	0.144	0.167	0.473
MIP-1 $\beta$	54.49 (-16.49-125.48)	25.61 (13.90-37.31)	0.405	14.30 (5.81-22.79)	30.97 (-10.86-72.79)	0.283	0.499	0.705



Table 3. Continued.

Immune compounds <sup>1</sup>	Mastitis group			Control group			Mastitis vs Control	
	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial P-value <sup>4</sup>	Final P-value <sup>4</sup>
Growth factors (ng/l)								
EGF ( $\times 10^3$ )	24.14 (21.15-27.13)	26.86 (23.57-30.15)	0.061	18.43 (14.66-22.20)	24.43 (17.14-31.71)	0.060	0.085	0.509
G-CSF	10.14 (-8.14-28.42)	12.85 (-1.89-27.60)		nd	6.04 (4.20-7.89)	-	-	0.478
GM-CSF	22.73 (8.55-36.91)	26.58 (6.92-46.23)	0.347	17.29 (1.64-32.95)	6.13 (-2.21-14.47)	0.017	0.687	0.293
IL-5	3.57 (-4.35-11.49)	nd	-	0.20	0.00	-	0.457	-
IL-7	1.23 (0.79-1.68)	12.61 (0.10-25.12)	0.070	1.53 (0.47-2.60)	14.62 (-4.43-33.68)	0.362	0.511	0.847
<sup>1</sup> EGF = epithelial growth factor, G-CSF = granulocyte colony stimulating factor, GM-CSF = granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GRO- $\alpha$ = growth related oncogene- $\alpha$ , Ig = immunoglobulin, IL = interleukin, IFN- $\gamma$ = interferon- $\gamma$ , MCP-1 = monocyte chemoattractant protein, MIP-1 $\beta$ = macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , TGF- $\beta_2$ = transforming growth factor- $\beta_2$ , TNF- $\alpha$ = tumour necrosis factor- $\alpha$ . <sup>2</sup> Results are expressed as mean (95% confidence interval) when data were normally distributed and as median (interquartile range) when not. <sup>3</sup> The paired t-test was used when data were normally distributed and the Wilcoxon paired signed-rank test when not. <sup>4</sup> The ANOVA test was used when the variable was normally distributed and the Mann-Whitney test when not. <sup>5</sup> nd = not detected.								

### Blood analyses

The four possible phenotypes of the Lewis antigen A/B were detected among the participants and no differences were observed between the two groups (data not shown); however, the A+/B+ phenotype was present only in one healthy volunteer (control group). Globally, values obtained for the tested haematological and biochemical parameters were within physiological ranges in both groups at both sampling times (Table 4). A significant decrease in the lymphocyte proportion ( $P=0.004$ ) and an increase in that of PMN cells ( $P=0.011$ ) after the probiotic treatment were noted in the mastitis group (Table 4).

No substantial changes were observed among the FAs profiles detected in the cellular fraction of blood, with a few exceptions: a decrease in the levels of adrenic acid (C22:4 n6) in the mastitis group ( $P=0.047$ ) and eicosatrienoic acid (C20:3 n6) in the control group ( $P=0.000$ ) after the treatment; and, an increase in total saturated FAs in the control group at the end of the study ( $P=0.036$ ) (Supplementary Table S3).

Most of OS markers showed a slight reduction after the probiotic intervention, although only the decrease in advanced oxidation protein products (AOPPs) levels, when expressed both in terms of absolute concentration and

after normalisation for protein content, was statistically significant in the mastitis group ( $P=0.008$  and  $P=0.003$ , respectively; Table 5). The correlation analysis to quantify the association between OS parameters in the mastitis group showed that, after the probiotic intervention, the concentration of AOPPs was positively correlated with thiobarbituric acid-reactive material (TBARM) ( $r=0.346$ ,  $P=0.004$ ) and nitrite levels ( $r=0.400$ ;  $P=0.001$ ) but a negative correlation was noted with isoprostanes ( $r=-0.254$ ;  $P=0.035$ ). Negative correlations were also noted between sulfhydryl groups and TBARM ( $r=-0.427$ ;  $P=0.000$ ) and isoprostanes and nitrite ( $r=-0.318$ ;  $P=0.008$ ) (Supplementary Table S4).

Blood levels of the selected immunological compounds were also within their physiological ranges (Table 6). All of the Igs tested were present in all blood samples except for IgE, which was not detected in one of the healthy volunteers (control group) at both sampling times and in two individuals from the mastitis group at the end of the study (Supplementary Table S2). IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and all chemokines were detected in more than 87% of the samples; IL-6, IL-12(p70), IL-7 and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) were found in 52-87%, and the rest of these immune compounds could be detected in less than 50% of them. Cytokines IL-10 and IL-13 were spotted in less than 20% of the samples from the mastitis group and were not present in samples from the control

**Table 4. Blood hematological and biochemical parameters in women of the mastitis and control groups before and after the probiotic intervention.**

Parameters <sup>1</sup>	Mastitis group (n=23)			Control group (n=8)			Mastitis vs Control	
	Initial (day 0) Mean (95% CI)	Final (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>2</sup>	Initial (day 0) Mean (95% CI)	Final (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>2</sup>	Initial P-value <sup>3</sup>	Final P-value <sup>3</sup>
<b>Hematological parameters</b>								
Leukocytes (cel/μl) (×10 <sup>3</sup> )	6.33 (5.74-6.92)	6.63 (5.93-7.33)	0.293	6.31 (5.47-7.15)	6.22 (5.23-7.22)	0.859	0.973	0.512
Red cells (cel/μl) (×10 <sup>9</sup> )	4.61 (4.45-4.76)	4.62 (4.51-4.72)	0.883	4.65 (4.41-4.89)	4.61 (4.36-4.87)	0.704	0.773	0.986
Hemoglobin (g/dl)	13.00 (12.56-13.44)	13.05 (12.69-13.41)	0.730	13.67 (13.41-13.93)	13.39 (12.96-13.81)	0.129	0.046	0.285
HCT (%)	40.16 (38.94-41.38)	40.10 (39.08-41.13)	0.901	41.75 (40.79-42.71)	41.56 (39.36-43.49)	0.820	0.105	0.137
MCV (fl)	87.35 (84.77-89.93)	87.03 (84.46-89.60)	0.548	90.06 (85.34-94.78)	29.09 (27.74-30.43)	0.814	0.265	0.174
MCH (pg)	28.29 (27.25-29.33)	28.32 (27.45-29.18)	0.883	29.52 (27.81-31.22)	29.30 (28.35-30.25)	0.427	0.202	0.327
MCHC (g/dl)	32.38 (31.78-32.97)	32.56 (31.93-33.18)	0.606	32.77 (31.91-33.63)	32.51 (31.89-33.13)	0.321	0.455	0.600
RDW (%)	14.43 (13.85-15.01)	14.55 (14.01-15.09)	0.419	13.59 (13.06-13.91)	13.61 (13.31-13.91)	0.890	0.094	0.042
Platelets (cel/μl) (×10 <sup>5</sup> )	2.69 (2.42-2.96)	2.57 (2.34-2.80)	0.260	2.49 (2.09-2.89)	2.43 (2.06-2.79)	0.713	0.419	0.487
MPV (fl)	8.32 (7.82-8.81)	8.28 (7.79-8.76)	0.863	7.75 (7.34-8.16)	8.11 (7.79-8.44)	0.080	0.360	0.681
Lymphocytes (%)	34.45 (31.51-37.38)	31.06 (28.23-33.89)	0.004	32.80 (26.80-38.80)	30.43 (24.54-36.31)	0.435	0.560	0.816
Monocytes (%)	5.22 (4.64-5.80)	5.04 (4.49-5.59)	0.367	5.08 (4.01-6.14)	5.06 (4.13-5.99)	0.978	0.791	0.966
PMN (%)	55.64 (52.20-59.08)	58.85 (55.37-62.32)	0.011	58.28 (52.41-64.14)	61.30 (55.36-67.24)	0.407	0.407	0.445
Eosinophils (%)	4.11 (2.47-5.76)	4.06 (1.76-6.35)	0.923	3.15 (1.86-4.44)	2.53 (1.48-3.57)	0.220	0.486	0.416
Basophils (%)	0.57 (0.45-0.69)	0.53 (0.42-0.64)	0.297	0.70 (0.45-0.95)	0.71 (0.51-0.91)	0.905	0.270	0.082
<b>Biochemical parameters</b>								
Glucose (mg/dl)	79.55 (76.89-82.20)	79.68 (77.21-82.27)	0.897	81.25 (77.02-85.48)	80.50 (76.31-84.69)	0.510	0.480	0.733
Uric acid (mg/dl)	4.45 (4.00-4.89)	4.40 (4.04-4.76)	0.796	4.76 (4.15-5.38)	4.45 (4.04-4.86)	0.189	0.421	0.883
Fe (μg/dl)	76.41 (62.54-90.27)	69.36 (59.41-79.32)	0.230	118.50 (75.25-161.75)	85.75 (68.04-103.46)	0.082	0.054	0.084
Ferritin (ng/ml)	32.49 (17.45-47.52)	29.15 (16.56-41.74)	0.185	76.65 (32.65-120.65)	62.56 (27.11-98.01)	0.042	0.011	0.019
GOT (IU/l)	24.86 (19.52-30.20)	22.91 (19.67-26.15)	0.357	30.50 (14.26-46.74)	24.63 (11.95-37.30)	0.146	0.346	0.677
GPT (IU/l) <sup>c</sup>	25.50 (19.00-33.00)	26.50 (15.00-33.00)	1.000	15.00 (11.00-117.50)	12.50 (11.50-54.50)	0.074	0.372	0.313
Triglycerides (mg/dl)	61.86 (55.08-68.65)	54.82 (49.93-59.71)	0.012	51.38 (41.95-60.80)	56.25 (45.35-67.15)	0.092	0.089	0.766
Total cholesterol (mg/dl)	200.59 (184.53-216.65)	187.91 (174.12-201.70)	0.003	189.38 (167.28-211.47)	196.75 (175.75-217.75)	0.181	0.432	0.477



Table 4. Continued.

Parameters <sup>1</sup>	Mastitis group (n=23)			Control group (n=8)			Mastitis vs Control	
	Initial (day 0) Mean (95% CI)	Final (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>2</sup>	Initial (day 0) Mean (95% CI)	Final (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>2</sup>	Initial P-value <sup>3</sup>	Final P-value <sup>3</sup>
hs-CRP (mg/dl)	0.35 (0.09-0.60)	0.28 (0.11-0.46)	0.672	0.19 (0.04-0.33)	0.33 (-0.09-0.75)	0.477	0.451	0.780

<sup>1</sup> GOT = glutamic-oxaloacetic transaminase; GPT = glutamate-pyruvate transaminase; HCT = hematocrit; hs-CRP = high sensitive C-reactive protein; Ig = immunoglobulins; IU = international units; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MPV = mean platelet volume; PMN = polymorphonuclear cells; RDW = red blood cell distribution width.  
<sup>2</sup> The paired t-test was used when data were normally distributed data and the Wilcoxon signed rank test when not.  
<sup>3</sup> The ANOVA test was used when the variable was normally distributed and the Mann-Whitney test when not.  
<sup>4</sup> Data were not normally distributed and the results are expressed as median (interquartile range).

Table 5. Plasma levels of parameters related to oxidative stress and nitric oxide metabolism in women of the mastitis and control groups before and after probiotic intervention.

Parameter <sup>1</sup>	Mastitis group (n=23)			Control group (n=8)			Mastitis vs Control	
	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial P-value <sup>4</sup>	Final P-value <sup>4</sup>
AOPPs (μmol/l)	60.81 (55.85-65.77)	52.52 (47.39-57.66)	0.003	50.69 (40.08-61.30)	53.53 (46.30-60.77)	0.257	0.287	0.730
AOPPs (nmol/mg protein)	0.78 (0.72-0.84)	0.68 (0.61-0.75)	0.008	0.64 (0.46-0.82)	0.68 (0.54-0.81)	0.473	0.042	0.823
SH groups (μmol/l)	428.00 (412.00-444.00)	422.00 (405.00-440.00)	0.430	440 (413-467)	437 (406-468)	0.586	0.501	0.498
SH groups (nmol/mg protein)	5.60 (5.19-6.00)	5.48 (5.10-5.85)	0.499	5.43 (4.83-6.03)	5.50 (4.54-6.46)	0.827	0.498	0.823
TBARM (μmol/l) <sup>5</sup>	24.40 (22.80-29.60)	23.80 (22.40-30.80)	0.697	24.10 (22.60-25.05)	23.70 (21.30-25.40)	0.779	0.526	0.398
MDA (μmol/l)	2.02 (1.76-2.28)	2.02 (1.69-2.36)	0.983	2.62 (2.22-3.02)	2.13 (1.67-2.60)	0.190	0.021	0.696
8-isoprostaglandin F <sub>2α</sub> (pg/ml)	180.00 (155.00-206.00)	166.00 (142.00-190.00)	0.175	157 (124-190)	172 (135-208)	0.361	0.324	0.917
NOx (μmol/l) <sup>5</sup>	22.14 (18.88-28.65)	26.04 (17.58-34.51)	0.438	22.14 (16.61-37.43)	22.47 (16.11-26.69)	0.128	0.954	0.896
Nitrite (μmol/l)	2.00 (1.72-2.27)	1.99 (1.70-2.28)	0.970	2.51 (2.28-2.75)	2.04 (1.60-2.48)	0.095	0.065	0.544
Nitrate (μmol/l) <sup>5</sup>	19.71 (15.89-27.11)	23.21 (15.40-33.21)	0.386	19.47 (14.28-34.81)	20.65 (13.45-25.08)	0.093	0.963	0.260

<sup>1</sup> AOPPs = advanced oxidation protein products; TBARM = thiobarbituric acid-reactive material; MDA = malondialdehyde; NOx = nitric oxide metabolism end products; SH = sulfhydryl.  
<sup>2</sup> Results are expressed as mean and 95% confidence interval when normal distribution is followed and as median and interquartile range when not.  
<sup>3</sup> The paired t-test was used when data were normally distributed and the Wilcoxon signed-rank test when not.  
<sup>4</sup> The ANOVA test was used when data were normal distributed and Mann-Whitney U test when not.  
<sup>5</sup> Data were not normally distributed.



volunteers (Supplementary Table S2). Lower levels of four immunological compounds in blood samples from women with mastitis were observed after the probiotic treatment: IgA ( $P=0.047$ ), IgG1 ( $P=0.066$ ), IL-2 ( $P=0.098$ ), and MCP-1 ( $P=0.062$ ); in contrast, only MCP-1 concentration decreased in blood samples taken from the control group ( $P=0.069$ ). Blood concentrations of IL-2 in the mastitis group were higher than those found in the control group at the beginning of the study ( $P=0.012$ ); however, IL-2 values were similar between both groups after the probiotic intervention (Table 6).

#### Comparison between milk and blood immunological analyses

Globally, Ig levels were higher in blood than in milk in both groups at both times, except for IgA (Tables 3 and 6). Differences were also found within the mastitis group when the concentrations of IL-4, IL-8, and IL-7 in blood serum were compared to those found in milk samples ( $P<0.011$ , paired t-tests or Wilcoxon tests), both at the beginning and at the end of the study, and when those of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-4, MIP-1 $\beta$ , and G-CSF were compared at the end of the study

**Table 6.** Concentrations of immunoglobulins and cytokines in plasma from women of the mastitis and control groups before and after the probiotic intervention.

Parameters <sup>1</sup>	Mastitis group			Control group			Mastitis vs Control	
	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial P-value <sup>4</sup>	Final P-value <sup>4</sup>
Immunoglobulins (g/l)								
IgA	2.51 (1.83-3.19)	1.96 (1.72-2.20)	0.047	1.89 (1.22-2.55)	2.05 (1.39-2.71)	0.112	0.295	0.725
IgE ( $\times 10^{-3}$ )	0.82 (0.58-1.07)	0.88 (0.58-1.18)	0.486	0.81 (0.20-1.41)	0.71 (0.25-1.17)	0.627	0.708	0.600
IgG1	10.18 (8.70-11.67)	9.15 (8.11-10.19)	0.066	8.38 (6.86-9.87)	10.65 (5.98-15.31)	0.143	0.166	0.299
IgG2	5.12 (3.83-6.41)	4.63 (3.77-5.48)	0.259	4.82 (2.77-6.87)	5.48 (3.59-7.38)	0.167	0.803	0.316
IgG3	1.12 (0.87-1.38)	1.03 (0.79-1.27)	0.191	1.34 (0.75-1.93)	1.55 (0.99-2.11)	0.230	0.405	0.038
IgG4	0.44 (0.24-0.65)	0.41 (0.23-0.59)	0.353	0.18 (-0.08-0.45)	0.23 (-0.13-0.59)	0.286	0.157	0.302
IgM	0.90 (0.40-1.39)	0.70 (0.46-0.94)	0.144	0.37 (0.29-0.45)	0.48 (0.26-0.69)	0.225	0.207	0.294
Innate immunity (ng/l)								
IL-1 $\beta$	6.44 (-5.46-18.34)	6.36 (-5.27-17.99)	0.411	0.84 (0.08-1.60)	1.34 (0.82-1.85)	0.170	0.458	0.468
IL-6	7.75 (5.08-10.42)	7.65 (4.91-10.38)	0.292	5.47 (3.08-7.86)	6.29 (5.34-7.24)	0.309	0.230	0.484
IL-12	586.52 (-661.38-1834.43)	370.19 (-416.88-1157.26)	0.336	9.75 (4.65-14.85)	11.83 (6.02-17.65)	0.131	0.528	0.481
IFN- $\gamma$	125.99 (79.50-172.47)	127.08 (92.18-161.97)	0.588	129.60 (73.01-186.18)	139.29 (85.69-192.88)	0.592	0.927	0.688
TNF $\alpha$	21.06 (12.54-29.58)	20.09 (13.13-27.06)	0.799	25.94 (13.06-38.82)	24.40 (18.94-29.86)	0.704	0.525	0.462
Acquired immunity (ng/l)								
IL-2	4.48 (2.26-6.70)	2.59 (0.59-4.59)	0.098	1.45 (0.65-2.26)	2.37 (-0.05-4.79)	0.866	0.012	0.666
IL-4	2.93 (1.78-4.08)	3.35 (2.31-4.39)	0.196	3.52 (1.57-5.48)	4.10 (2.29-5.92)	0.283	0.563	0.422
IL-10	20.10 (-35.19-75.39)	23.63 (-67.56-114.81)	0.685	1.77	nd		0.669	
IL-13	317.00 (-3640.47-4274.47)	287.09 (-3280.43-3854.61)	0.508	nd <sup>b</sup>	nd			

Table 6. Continued.

Parameters <sup>1</sup>	Mastitis group			Control group			Mastitis vs Control	
	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial <sup>2</sup> (day 0) Mean (95% CI)	Final <sup>2</sup> (day 21) Mean (95% CI)	P-value <sup>3</sup>	Initial P-value <sup>4</sup>	Final P-value <sup>4</sup>
IL-17	37.73 (5.69-69.77)	29.40 (4.59-54.21)	0.906	26.88 (-6.20-59.95)	18.42 (4.04-32.80)	0.398	0.598	0.508
Chemokines (ng/l)								
IL-8	9.09 (5.96-12.21)	10.35 (7.07-13.62)	0.818	13.05 (5.65-20.46)	13.00 (7.95-18.05)	0.978	0.210	0.349
MCP-1	57.36 (45.19-69.53)	52.52 (39.88-65.16)	0.062	58.72 (38.72-78.72)	52.17 (31.53-72.82)	0.069	0.904	0.976
MIP-1 $\beta$	75.24 (65.57-84.90)	74.12 (64.55-83.69)	0.691	76.13 (51.08-101.18)	70.79 (45.60-95.99)	0.202	0.929	0.741
Growth factors (ng/l)								
G-CSF	49.85 (32.25-67.46)	45.43 (35.42-55.44)	0.650	31.25 (26.15-36.36)	39.19 (24.22-54.16)	0.547	0.206	0.446
GM-CSF	2.86 (-32.66-38.37)	190.10 (-321.27-701.47)	0.344	2.85 (-32.66-38.37)	3.81 (-6.79-14.42)		0.596	0.572
IL-5	6.50 (1.54-11.46)	5.90 (-2.53-14.34)	0.752	2.58 (-0.16-5.33)	2.32 (0.41-4.22)	0.925	0.157	0.367
IL-7	30.73 (22.57-38.89)	30.95 (22.18-39.73)	0.424	30.14 (23.29-36.99)	31.18 (17.59-44.76)	0.303	0.918	0.974

<sup>1</sup> G-CSF = granulocyte colony stimulating factor, GM-CSF = granulocyte-macrophage colony stimulating factor, Ig = immunoglobulin, IL = interleukin, IFN- $\gamma$  = interferon- $\gamma$ , MCP-1 = monocyte chemoattractant protein, MIP-1 $\beta$  = macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  = tumour necrosis factor- $\alpha$ .  
<sup>2</sup> Results are expressed as mean (95% confidence interval) when data were normally distributed and as median (interquartile range) when not.  
<sup>3</sup> The paired t-test was used when data were normally distributed and the Wilcoxon paired signed-rank test when not.  
<sup>4</sup> The ANOVA test was used when the variable was normally distributed and the Mann-Whitney test when not.  
<sup>5</sup> Data were not normally distributed.  
<sup>6</sup> nd = not detected.

( $P < 0.045$ , paired t-tests or Wilcoxon tests). In relation to samples taken from the control group, blood concentrations of IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2, chemokines, IL-7 and G-CSF were different to those found in milk samples at the beginning of the study ( $P < 0.027$ , ANOVA or Mann-Whitney U test), while those of IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and G-CSF differed at the end of the study ( $P < 0.028$ , ANOVA or Mann-Whitney U test) (data not shown).

In addition, the percentage of samples where these immune compounds were detected was higher in blood than in milk, with the exception of IL-1 $\beta$  and GM-CSF that were found more frequently in milk samples of both groups at both sampling times (Supplementary Table S2). The heatmap obtained after hierarchical clustering considering the relative frequencies of detection of immune compounds from both plasma and milk samples (before and after the probiotic intervention) is shown in Supplementary Figure S1. A clear separation depending on sample type was observed.

#### Correlations between markers of oxidative damage, nitrite and clinical parameters

Some statistically significant relationships between parameters of OS, nitric oxide metabolism and clinical indicators were also noted in the mastitis group (Supplementary Table S4). Globally, correlations between OS markers (AOPPs, TBARM and malondialdehyde) and relevant lipid profile parameters, such as triacylglycerides and total cholesterol, were revealed at the end of the intervention. Similarly, after probiotic intake, important relationships between AOPPs and nitrite and some immunological parameters (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-2) were also noted (Supplementary Table S4).

#### Urine analysis

Values obtained for urine parameters were within physiological ranges and no differences associated to the probiotic treatment could be observed (data not shown).



#### 4. Discussion

Empirical beneficial effects of probiotics on some human diseases have been shown in well-designed clinical trials but these effects are strain-specific and may involve different mechanisms. Therefore, potential probiotic organisms to treat or prevent a specific disease need to be selected in a rational manner, following the FAO/WHO guidelines (FAO/WHO, 2002). In relation to mastitis, an initial pilot trial with a placebo group showed the potential of two combined strains (*L. salivarius* CECT5713 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714) for the treatment of this condition (Jiménez et al., 2008). Later, the efficacy of two independent strains, *L. salivarius* CECT5713 and *Lactobacillus fermentum* CECT5716, was compared to antibiotic therapy in a clinical study involving 352 women with staphylococcal or streptococcal mastitis (Arroyo et al., 2010). The results indicated that lactobacilli strains specifically selected for the mastitis target may be a good alternative or complement to treat such condition. The highest reductions in bacterial counts were associated to the probiotic group receiving the *L. salivarius* strain and, in addition, this was the only group from which no adverse effect was reported.

In this work, another human milk strain (*L. salivarius* PS2) with improved properties with respect to *L. salivarius* CECT 5713, such as better stability or absence of prophages in its genome (Langa et al., 2012), was tested for the same target. In addition, possible milk, urine and blood biomarkers that could be associated to its potential therapeutical benefit and that, therefore, may help to explain its *in vivo* mechanism of action were searched for.

The effect of *L. salivarius* PS2 on the total bacterial count in human milk was similar to those previously reported for other strains (Arroyo et al., 2010; Jiménez et al., 2008), and a direct relationship between the decrease in staphylococcal/streptococcal counts and the clinical outcome was also observed. In fact, some lactic acid bacteria isolated from human milk, including *L. salivarius* strains, may have the potential to inhibit *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci through different mechanisms (Beasley and Saris, 2004; Langa et al., 2012; Martín et al., 2006). Women recruited in this study reported a complete or notable improvement after the treatment. Recently, a urinary metabolomic study revealed that consumption of *L. salivarius* PS2 by women with mastitis led to a voluntary desertion of the intake of ibuprofen and acetaminophen, two drugs used to control mastitis-associated pain (Vázquez-Fresno et al., 2014).

The administration of the probiotic strain did not affect the macronutrient content of milk, which was within normal ranges (Ballard and Morrow, 2013) at the end of the study. Electrolytes present in milk reflect the mammary epithelial integrity, which is achieved gradually after parturition

through the closure of the tight junctions, because they are controlled by transport mechanisms (Neville et al., 1991). In this study, reduced potassium levels and increased IgG3 levels after the *L. salivarius* PS2 treatment suggest an improvement of the integrity of the mammary gland epithelium. IgG1 and IgG3 transport is a competitive mechanism mediated by a receptor that favours the IgG3 subclass in milk, which has higher effector capabilities (Stapleton et al., 2011) and reduces infection rate in immunodeficient individuals (Shapiro, 2012). This fact suggests that this parameter may be a simple and useful surrogate biomarker.

Lower levels of IL-8 and other cytokines and chemokines (such as IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12(p70), TNF- $\alpha$ , MCP-1 and MIP-1 $\beta$ ) were found in milk as a consequence of the probiotic treatment, and may explain the improvement of the inflammation state associated to mastitis. However, there was a wide inter-individual variability in relation to such parameters, a fact that has been reported previously (Agarwal et al., 2011; Espinosa-Martos et al., 2013). The impact of the inter-individual variability on the statistical analysis could be reduced in future studies by increasing the number of participants. Significantly, the 95% CI of different parameters were notably narrower after the probiotic treatment which indicates less dispersion of data and suggests a normalisation of their levels. The immunomodulatory effects of the probiotic treatment are not strange since it has been reported that a *L. salivarius* strain isolated from human milk strongly stimulated immature dendritic cells (Langa et al., 2012) and monocytes seemed to play a key role in the transfer of selected bacteria from the maternal gut to the mammary epithelium during late pregnancy and lactation (Perez et al., 2007; Rodríguez, 2014).

Manipulation of the maternal gut microbiota by probiotic supplementation affects milk immune factors and could partially explain its anti-mastitis effect. The administration of some probiotic strains during late pregnancy and/or breastfeeding increases TGF- $\beta_2$  levels in human milk (Nikniaz et al., 2013; Prescott et al., 2008). In this study, the increase in the trophic factors EGF and TGF- $\beta_2$  may have contributed to immunomodulation in the mammary epithelium, which may also benefit the infant. TGF- $\beta_2$  is a key mammary immunoregulatory factor, promoting local IgA production and inducing oral tolerance mechanisms in infants (Oddy and Rosales, 2010; Stavnezer, 1995). In contrast, oral supplementation with a *Lactobacillus reuteri* strain to pregnant women reduced the TGF- $\beta_2$  levels in colostrum (Böttcher et al., 2008). This apparent contradictory result may be due to differential immune responses exerted by different bacterial strains, and may explain why different probiotic strains have different applications.



The lack of a mastitis control group (either untreated or receiving placebo) is one of the main limitations of this study. However, results from previous clinical trials (Arroyo *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2008) suggest that it is highly improbable that clinical improvements were not due to probiotic intake. In such studies, women with mastitis belonging to the placebo or control groups felt similar, or even worse, at the end of the trials. In addition, a recent metabolomic study showed that mastitis improvement was coincident with the presence of probiotic-related metabolites in urine samples (Vázquez-Fresno *et al.*, 2014). In conclusion, the present study has revealed some microbiological, biochemical and immunological biomarkers that will be very useful when assessing the effects of the probiotic in a larger cohort.

### Supplementary material

Supplementary material can be found online at <http://dx.doi.org/10.3920/BM2015.0134>.

**Figure S1.** Heat-map of the detection frequencies of immune compounds found in plasma and milk samples, before (day 0) and after (day 21) the probiotic treatment.

**Table S1.** Fatty acid composition of milk from women of the mastitis and control groups before and after probiotic intervention.

**Table S2.** Detection frequencies (%) of immune compounds in milk and plasma samples from women of the mastitis and control groups before and after the probiotic intervention.

**Table S3.** Plasma fatty acid composition from women of the mastitis and control groups before and after the probiotic intervention.

**Table S4.** Correlations between markers of oxidative stress, nitric oxide metabolism and hematological, biochemical and immunological parameters before and after the probiotic intervention in the mastitis group.

### Acknowledgments

We thank all volunteers, doctors, and midwives that participated in the study. This work was supported by a research contract of Nutricia/Danone Research (Utrecht, The Netherlands), and FUN-C-FOOD (Consolider-Ingenio 2010), AGL2011-26713 and AGL2013-41980-P projects from the Ministry of Economy and Competitiveness, Spain. We are grateful to Dr. R. Martin (Nutricia, Singapore) and Centro Superior de Idiomas Modernos (CSIM, Complutense University of Madrid, Spain) for their review of the manuscript.

### References

- Agarwal, S., Karmaus, W., Davis, S. and Gangur, V., 2011. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *Journal of Human Lactation* 27: 171-186.
- Arroyo, R., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Fernández, L. and Rodríguez, J.M., 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical Infectious Diseases* 50: 1551-1558.
- Ballard, O. and Morrow, A.L., 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America* 60: 49-74.
- Beasley, S.S. and Saris, P.E., 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5051-5053.
- Begović, J., Jovčić, B., Papić-Obradović, M., Veljović, K., Lukić, J., Kojić, M. and Topisirović, L., 2013. Genotypic diversity and virulent factors of *Staphylococcus epidermidis* isolated from human breast milk. *Microbiology Research* 168: 77-83.
- Böttcher, M.F., Abrahamsson, T.R., Fredriksson, M., Jakobsson, T. and Björkstén, B., 2008. Low breast milk TGF-beta2 is induced by *Lactobacillus reuteri* supplementation and associates with reduced risk of sensitization during infancy. *Pediatric Allergy and Immunology* 19: 497-504.
- Codoñer-Franch, P., Tavárez-Alonso, S., Murria-Estal, R., Megías-Vericat, J., Tortajada-Girbés, M. and Alonso-Iglesias, E., 2011. Nitric oxide production is increased in severely obese children and related to markers of oxidative stress and inflammation. *Atherosclerosis* 215: 475-480.
- Codoñer-Franch, P., Tavárez-Alonso, S., Murria-Estal, R., Tortajada-Girbés, M., Simó-Jordá, R. and Alonso-Iglesias, E., 2012. Elevated advanced oxidation protein products (AOPPs) indicate metabolic risk in severely obese children. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 22: 237-243.
- Contreras, G.A. and Rodríguez, J.M., 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16: 339-356.
- Delgado, S., Arroyo, R., Martín, R. and Rodríguez, J.M., 2008. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infectious Diseases* 8: 51.
- Delgado, S., Arroyo, R., Jiménez, E., Marín, M.L., Del Campo, R., Fernández, L. and Rodríguez, J.M., 2009. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC Microbiology* 9: 82.
- Espinosa-Martos, I., Montilla, A., De Segura, A.G., Escuder, D., Bustos, G., Pallás, C., Rodríguez, J.M., Corzo, N. and Fernández, L., 2013. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurization. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 56: 560-568.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO), 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Available at: <http://tinyurl.com/ou88oa2>.

I. Espinosa-Martos et al.

- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.G. and Buchner, A., 2007. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods* 39: 175-191.
- Fernández, L., Langa, S., Martín, V., Maldonado, A., Jiménez, E., Martín, R. and Rodríguez, J.M., 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research* 69: 1-10.
- Fernández, L., Arroyo, R., Espinosa, I., Marín, M., Jiménez, E. and Rodríguez, J.M., 2014. Probiotics for human lactational mastitis. *Beneficial Microbes* 5: 169-183.
- Frodermann, V., Chau, T.A., Sayedyahosseini, S., Toth, J.M., Heinrichs, D.E. and Madrenas, J., 2011. A modulatory interleukin-10 response to staphylococcal peptidoglycan prevents Th1/Th17 adaptive immunity to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases* 204: 253-262.
- Hunt, K.M., Preuss, J., Nissan, C., Davlin, C.A., Williams, J.E., Shafii, B., Richardson, A.D., McGuire, M.K., Bode, L. and McGuire, M.A., 2012. Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 4763-4770.
- Jiménez, E., Fernández, L., Maldonado, A., Martín, R., Olivares, M., Xaus, J. and Rodríguez, J.M., 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4650-4655.
- Langa, S., Maldonado, A., Delgado, S., Martín, R., Martín, V., Jiménez, E., Ruiz-Barba, J.L., Mayo, B., Connor, R.I., Suárez, E. and Rodríguez, J.M., 2012. Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94: 1279-1287.
- Martín, R., Jiménez, E., Olivares, M., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J. and Rodríguez, J.M., 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology* 112: 35-43.
- Neville, M.C., Allen, J.C., Archer, P.C., Casey, C.E., Seacat, J., Keller, R.P., Lutes, V., Rasbach, J. and Neifert, M., 1991. Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition* 54: 81-92.
- Nikniaz, L., Ostadrahimi, A., Mahdavi, R., Hejazi, M.A. and Salekdeh, G.H., 2013. Effects of synbiotic supplementation on breast milk levels of IgA, TGF- $\beta$ 1, and TGF- $\beta$ 2. *Journal of Human Lactation* 29: 591-596.
- Perez, P.F., Doré, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., Segura-Roggero, I., Schiffrin, E.J. and Donnet-Hughes, A., 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 119: 724-732.
- Oddy, W.H. and Rosales, F., 2010. A systematic review of the importance of milk TGF-beta on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatric Allergy and Immunology* 21: 47-59.
- Otto, M., 2013. Coagulase-negative staphylococci as reservoirs of genes facilitating MRSA infection: staphylococcal commensal species such as *Staphylococcus epidermidis* are being recognized as important sources of genes promoting MRSA colonization and virulence. *Bioessays* 35: 4-11.
- Paviour, S., Musaad, S., Roberts, S., Taylor, G., Taylor, S., Shore, K., Lang, S. and Holland, D., 2002. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clinical Infectious Diseases* 35: 1434-1440.
- Prescott, S.L., Wickens, K., Westcott, L., Jung, W., Currie, H., Black, P.N., Stanley, T.V., Mitchell, E.A., Fitzharris, P., Siebers, R., Wu, L., Crane, J. and Probiotic Study Group, 2008. Supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* or *Bifidobacterium lactis* probiotics in pregnancy increases cord blood interferon-gamma and breast milk transforming growth factor-beta and immunoglobulin A detection. *Clinical Experimental Allergy* 38: 1606-1614.
- Rodríguez, J.M., 2014. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in Nutrition* 5: 779-784.
- Rodríguez-Alcalá, L.M., Harte, F. and Fontecha, J., 2009. Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high pressure homogenization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 32-36.
- Schleifer, K.H., Hartinger, A. and Götz, F., 1978. Occurrence of D-tagatose-6-phosphate pathway of D-galactose metabolism among staphylococci. *FEMS Microbiology Letters* 3: 9-11.
- Schoenfeld, E.M. and McKay, M.P., 2010. Mastitis and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): the calm before the storm? *Journal of Emergency Medicine* 38: e31-34.
- Shapiro, R.S., 2012. Improved IgG3 levels and reduced infection rate in a woman with CVID switched from intravenous to subcutaneous immunoglobulin therapy. *Immunotherapy* 4: 1835-1839.
- Stapleton, N.M., Andersen, J.T., Stemerding, A.M., Bjarnarson, S.P., Verheul, R.C., Gerritsen, J., Zhao, Y., Kleijer, M., Sandlie, I., De Haas, M., Jonsdottir, I., Van der Schoot, C.E. and Vidarsson, G., 2011. Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. *Nature Communications* 2: 599.
- Stavnezer, J., 1995. Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. *Journal of Immunology* 155: 1647-1651.
- Vázquez-Fresno, R., Llorach, R., Marín, J., Tulipani, S., Garcia-Aloy, M., Espinosa-Martos, I., Jiménez, E., Rodríguez, J.M. and Andres-Lacueva, C., 2014. Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. *Pharmacological Research* 87: 160-165.
- Wang, J., Rodriguez, G. and Norcross, M.A., 2012. Control of adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus* through IL-10, PD-L1, and TLR2. *Scientific Reports* 2: 606.



IV.3. Gene expression modulation of milk somatic cells of women with mastitis  
in response to the consumption of *Lactobacillus salivarius* PS2

de Andrés J, Jiménez E, Espinosa-Martos I, Rodríguez JM, García-Conesa MT.

Manuscrito en preparación.





## Gene expression modulation of milk somatic cells of women with mastitis in response to the consumption of *Lactobacillus salivarius* PS2

Javier de Andrés<sup>1</sup>, Esther Jiménez<sup>1,2</sup>, Irene Espinosa-Martos<sup>1,2</sup>, Juan Miguel Rodríguez<sup>1,2</sup>, María-Teresa García-Conesa<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> *Department of Nutrition, Food Science and Technology, University Complutense of Madrid, Av. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain*

<sup>2</sup> *ProbiSearch, SLU. Calle de Santiago Grisolia, 2, 28760 Tres Cantos, Madrid, Spain.*

<sup>3</sup> *Research Group on Quality, Safety and Bioactivity of Plant Foods, Department of Food Science and Technology, Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Espinardo, Murcia, Spain.*

### Introduction

Human milk is a complex biological fluid produced by the mammary gland and adapted to satisfy the requirements of the newborn at different growth stages. Additionally, human milk educates the infant immune system, enhancing oral tolerance, and confers a certain degree of protection against pathogens (Andreas, Kampmann et al. 2015, Goldsmith, O'Sullivan et al. 2015, Boix-Amoros, Collado et al. 2016). These effects reflect the synergistic action of many cells and bioactive molecules, present in colostrum and milk, including immunocompetent cells, immunoglobulins, fatty acids, polyamines, oligosaccharides, lysozyme, lactoferrin and other glycoproteins, and antimicrobial peptides (Ballard, Morrow 2013).

Colostrum and milk are continuous sources of commensal, mutualistic and potentially probiotic bacteria to the infant gut (Gueimonde, Laitinen et al. 2007, Collado, Delgado et al. 2009, Martín, Jiménez et al. 2009, Hunt, Foster et al. 2011). Among the complex bacteria diversity present in human milk of healthy women, staphylococci and streptococci are the dominant genera but in a low concentration. On the other hand, fresh milk samples from women suffering mastitis have shown by culture techniques a high amount one of these two genera, or both, and a complete loss of bacterial

diversity (Mediano, Fernández et al. 2017).

Although a lot of work has been carried out in dairy ruminants, mastitis is a usual problem in women affecting more than 30% of the total lactating women population (World Health Organization (WHO), Department of Child and Adolescent Health and Development 2000). Bacteria responsible for the mastitis activate a complex immune defense cascade that involves resident and recruited immune, endothelial and epithelial mammary cells resulting in higher number of somatic cells (SC), mammary gland inflammation (Cremonesi, Capoferri et al. 2012) and tight junction relaxation (Stelwagen, Singh 2014).

Several studies have been carried out using probiotic strains to treat infectious mastitis as an alternative of antibiotic treatment. Their results showed that the orally intake of two different species of lactobacilli by mastitis-suffering women led to a significant reduction in the milk bacterial count and to a rapid improvement of their condition (Jiménez, Fernández et al. 2008, Arroyo, Martín et al. 2010). Moreover, the different strains administered during those trials were isolated from the human milk of the mastitis-suffering women at the end of the study (Jiménez, Fernández et al. 2008). Recently, the *Lactobacillus salivarius*

PS2, a probiotic strain isolated from human milk of healthy women, was tested in a new mastitis clinical trial to find microbiological, biochemical and immunological biomarkers (Espinosa-Martos, Jiménez et al. 2016). Women with mastitis that ingested this strain improved at the end of the treatment (Espinosa-Martos, Jiménez et al. 2016).

Over the past years transcriptomic studies using microarrays have increased dramatically and have been repeatedly applied to identify genes and pathways altered in mammary tissue in response to infection in bovine (Bonnetfont, Toufeer et al. 2011, Brenaut, Lefevre et al. 2014). In human, there is a lack of knowledge in this field, therefore, the main objective of this study was to study in depth how mammary gland's immune system responds to bacterial infection. We have investigated the molecular changes associated with mastitis infection and the response triggered by *L. salivarius* PS2 in SC from milk of women with and without mastitis using microarrays.

## Materials and Methods

### *Subjects and study design*

A total of 23 women with mastitis symptoms and 8 without any symptom of the disease, as a control group, took part in the study. A questionnaire about their general health status, pregnancy, delivery, lactating period and medication taken was filled out by all the participants. None of them ingested any commercial probiotic supplements during the intervention. The criteria for selecting the participants are described by Espinosa-Martos et al., (2016). All volunteers gave written informed consent to the protocol (reference 10/017E) approved by the Ethical Committee of Clinical Research of the Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). Based on previous evidence of past clinical trials (Jiménez, Fernández et al. 2008, Arroyo, Martín et al. 2010, Vázquez-Fresno, Llorach et al. 2014), the Ethical Committee did not allowed a control group of women with mastitis (either left untreated or receiving a

placebo). The study was registered in the ClinicalTrials.gov database (NCT01124448). The demographic characteristics for women are compiled in Supplementary Table 1.

The intervention period lasted 21 days and, during this period, all the volunteers consumed  $\sim 9.5 \log_{10}$  CFU of *Lactobacillus salivarius* PS2. The capsules with  $\sim 50$  mg of a freeze-dried probiotic or placebo were manufactured by Biopolis (Valencia, Spain). Mastitis symptoms were assessed at days 0, 7 and 21 by midwives of Primary Health Centers.

Milk and blood samples were collected at the beginning (Day 0) and at the end (Day 21) of the study, following the protocol previously described (Espinosa-Martos, Jimenez et al. 2016). Milk cells were isolated from 10 mL of fresh milk after centrifugation at 620 g for 20 minutes and removal of fat layer and supernatant. Allprotect Tissue Reagent (QIAGEN) was added for the preservation of the DNA, RNA and proteins of the SC and were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *RNA extraction*

Total RNA was isolated from SC and PBMCs using the AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit (Qiagen, Madrid, Spain) following the manufacturer recommendations. RNA concentration and purity were checked using the Nanodrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (Nanodrop Technologies) and the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Madrid, Spain). Only those samples with a ratio  $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$  between 1.8 and 2.1 and RNA integrity number (RIN) values above 6.0 were used in microarray experiments. Purified RNA samples were divided in aliquots and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further analysis.

### *Microarrays analysis*

RNA from milk samples were hybridized onto the GeneChip® PrimeView™ Human Gene Expression Array (Affymetrix, CA, USA) that contains a

total of 49,395 probe sets. Microarrays were carried out following manufacturer's instruction and GeneChips were scanned using the GeneChip Scanner 3000 7G with autoloader. Emission intensities of the different probe sets were captured and transformed (.CEL files) by Affymetrix GeneChip® Command Console® Software (Affymetrix, CA, USA). Probes were summarized to gene level data, background subtracted, and expression values normalized to log base-2 in Partek Genomics Suite v6.6 (Partek, St. Louis, MO) using the Robust MultiChip Average (RMA) algorithm and the .CEL files (Bolstad et al., 2003). Significant statistical differences (*p*-values) in gene expression (fold-changes) were generated with Partek Genomics Suite 6.6 using the ANOVA test. Probes were considered to be significantly and differentially expressed (DE) if the *p*-value was <0.05 and had minimum fold change (FC) value <-1.2 or > 1.2. Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) compliant data have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus database (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) at the accession number GSE65152.

#### *Microarrays data functional analysis*

Only significant genes were used for hierarchical clustering and enriched KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways analysis using Partek Pathway and the Fisher's exact test. Gene ontology analysis was carried out in the DAVID platform (Huang da, Sherman et al. 2009a, Huang da, Sherman et al. 2009b) for each gene cluster generated with hierarchical clustering analysis.

#### *RT-PCR analysis for target genes*

Changes in the expression of some selected target genes were validated using quantitative RT-PCR (Taqman system, ABI, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions in Parque Tecnológico de Madrid facilities. The Supplementary Table 2 includes the genes

and reference genes selected and the TaqMan Assays used for validation.

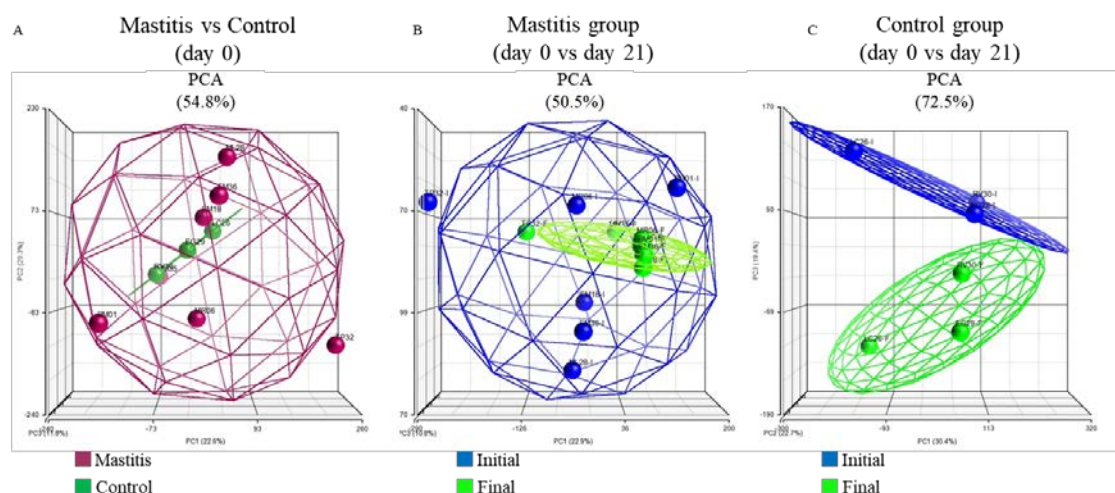
Samples with a Ct value  $\geq 35$  were considered not detected. NormFinder algorithm (Andersen, Jensen et al. 2004) was implemented to determine the stability and ranking of expression of the endogenous control genes. We additionally calculated the coefficient of variation of the Ct values (Ct CV%) for each reference gene across all the samples [ref]. The calculated values for *GAPDH*, *TBP* and *POLR2A* indicated a good stability for the three genes. The average Ct values (three technical replicates) for targeted and reference genes were obtained from each reaction to determine the occurrence of gene expression in the tested samples. The relative mRNA level of each targeted gene was calculated by the  $2^{-\Delta Ct}$  method (Livak, Schmittgen 2001). Final data are expressed as the mean FC value normalized against the three selected reference genes.

## **Results**

### *Positive effect of L. salivarius PS2 on healthy women and women with mastitis*

RNA of good quality was obtained from human milk cells of 7 women diagnosed with mastitis and 3 healthy volunteers. Microarray results were compared between participants with mastitis and healthy volunteers at baseline (day 0) to detect DE genes potentially associated with the disease. A total of 1377 probes (*p*-value < 0.05) were identified of which 309 were upregulated and 1068 were downregulated. When comparing initial (day 0) and final (day 21) samples from women with mastitis, 387 probes were found upregulated and 81 downregulated. Additionally, the comparison of initial and final samples from healthy volunteers showed 575 probes upregulated and 336 downregulated.

Principal component analysis (PCA) of three different comparisons were performed and plotted in base on the significant genes mentioned above



**Figure 1.-** Principal Component Analysis (PCA) of transcriptomic analysis developed in somatic cells isolated from human milk of women with and without mastitis before and after probiotic intake. Color balls represents each participant condition for the PCA plotted. Spheroids surfaces represents at least the 95% of the samples included for in each condition plotted. (A) PCA of baseline conditions for participants with (red balls) and without mastitis (green balls). (B) PCA of participants with mastitis at day 0 (blue balls) and day 21 (red balls). (C) PCA of participants without mastitis at day 0 (blue balls) and day 21 (green balls).

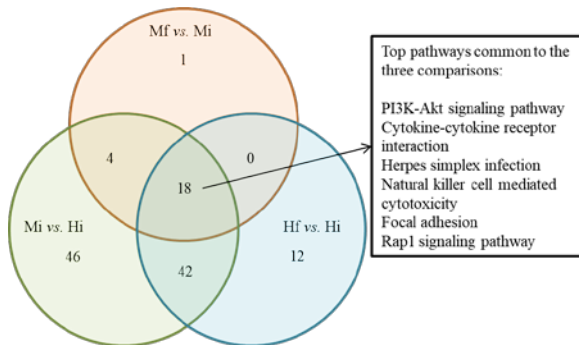
(Figure 1). At the PCA where initial samples (day 0) of mastitis (M) group and control (C) group were included, samples from healthy women aggregated while samples from women suffering mastitis were more dispersed (Figure 1A), resulting in two very different groups of samples with a 54.8% of variability explained in this plot. Regarding M group, initial mastitis samples (day 0) showed a higher dispersion than samples collected at the end of the treatment with the probiotic strain (day 21). PCA plot of the three first components explained the 50.5% of the variance (Figure 1B). In C group, initial and final milk samples were perfectly separated in the PCA (72.5% of variability) (Figure 1C), showing an effect of the probiotic treatment in healthy women.

Heatmaps with hierarchical clustering of the significant DE genes for the three comparisons made are illustrated in Figure 2. Uppermost enriched GO terms and altered inflammation- and cell growth/survival-related pathways among DE genes between volunteers with mastitis and healthy individuals and in both groups of participants following treatment with the probiotic is presented in Supplementary Table 3. Among DE genes in volunteers with mastitis in comparison with healthy

participants (potentially disease-related deregulated molecules), the most enriched GO terms associated with upregulation were immune response and activation of immune cells, indicative of the triggering of defense mechanisms against the infection. We also detected alteration of cell proliferation, adhesion and angiogenesis as well as general cell processes such as transmembrane receptor tyrosine kinase mediated signaling pathway, mRNA processing, and protein metabolic processes suggesting that SC isolated from participants with mastitis are highly metabolic active cells. Treatment with the probiotic in participants with mastitis also revealed alteration of cell death, transcription, amino acid metabolism, transmembrane transport and the glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor biosynthesis, a molecule that attaches some membrane proteins to the lipid bilayer of the cell membrane. DE genes in control group showed in up-regulated cluster the most enriched GO terms associated were cell adhesion and junction organization, regulation of transmembrane receptor, regulation of transforming growth factor-beta 2 (TGF- $\beta_2$ ) production, positive regulation of cell morphogenesis involved in differentiation, positive regulation of epithelial to mesenchymal transition, regulation of lymphocyte apoptosis,

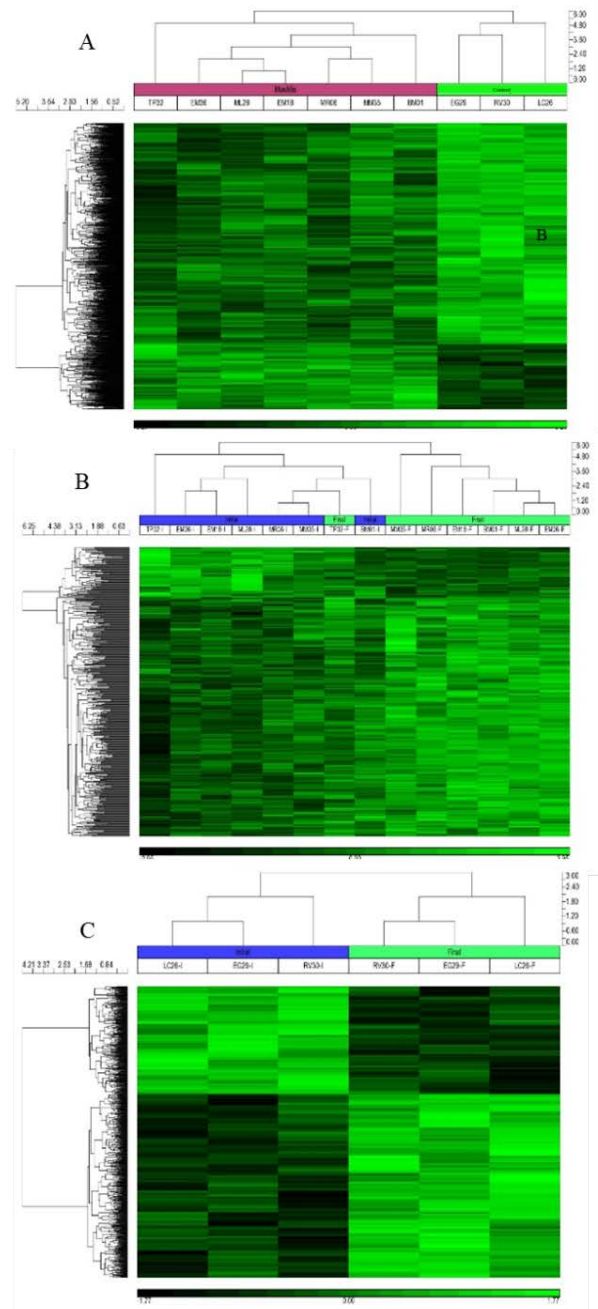
regulation of T cell activation and potassium ion transport. In down-regulated genes, the GO terms were regulation of protein catabolic process, regulation of lipid metabolic process and regulation of cell cycle and cell growth.

A Venn diagram summarizing the number of top represented overlapped pathways related to infection/immune response and cell growth/survival among the DE probes detected in the three comparisons is depicted in Figure 3. Various identifiers were commonly found in the three cases: ‘PI3K-Akt signaling pathway’, ‘cytokine-cytokine receptor interaction’, ‘herpes simplex infection’, ‘natural killer cell mediated cytotoxicity’, ‘focal adhesion’ and ‘Rap1 signaling pathway’.



**Figure 3.-** Venn diagram summarizing top overlapped pathways related to infection/immune response and cell growth/survival among the DE probes detected in cells isolated from human milk samples of women with and without mastitis before and after probiotic treatment. Green circle shown the number of pathways obtained in the comparison made with samples of women with (Mi) and without mastitis (Hi); red circle shown the number of pathways obtained in the comparison of women with mastitis at day 0 (Mi) and day 21 (Mf); blue circle shown the number of pathways obtained in the comparison made for samples of women without mastitis at day 0 (Hi) and day 21(Hf). Intersections represents number of overlapped pathways.

KEGG analysis showed several pathways related to immune response and metabolism in Mastitis. Further, the baseline comparison made between Mastitis and Controls shown pathways related to immune response, hormone control and fatty acid degradation. In Control group there were only 5 pathways implicated, headed by TGF- $\beta$  signaling pathway (Supplementary Table 4 “Pathways KEGG”).



**Figure 2.-** Heatmap representing the differences in the expression of genes of somatic cells isolated from human milk, when different conditions were compared. Each row represents an specific probe, and each column represents each one of the samples obtained from women with and without mastitis before and after probiotic intake. The bar below the heatmap indicates the changes in expression level for each gene analyzed in a color scale from black (downregulated) to light green (upregulated). Hierarchical clustering of the samples analyzed are shown in the upper dendrograms. Color-coded bar accompanying the dendrogram represents each of the conditions analyzed. a) Gene expression differences associated with the disease, i.e. DE genes between participants with mastitis (red top bar) vs. control participants (green top bar) at day 0; b) Genes expression changes associated with treatment with probiotic in participants with mastitis, i.e. DE genes of participants with mastitis at day 0 (blue top bar) vs. day 21 (green top bar), after treatment; c) Gene expression changes associated with treatment with the probiotic in healthy volunteers, i.e. DE genes of healthy volunteers at day 0 (blue top bar) vs. day 21 (green top bar), after treatment; ( $p$ -value  $<0.05$ ,  $FC > 1.2$  or  $<-1.2$ ).



**Table 1.-** Genes selected for further analysis by RT-PCR.

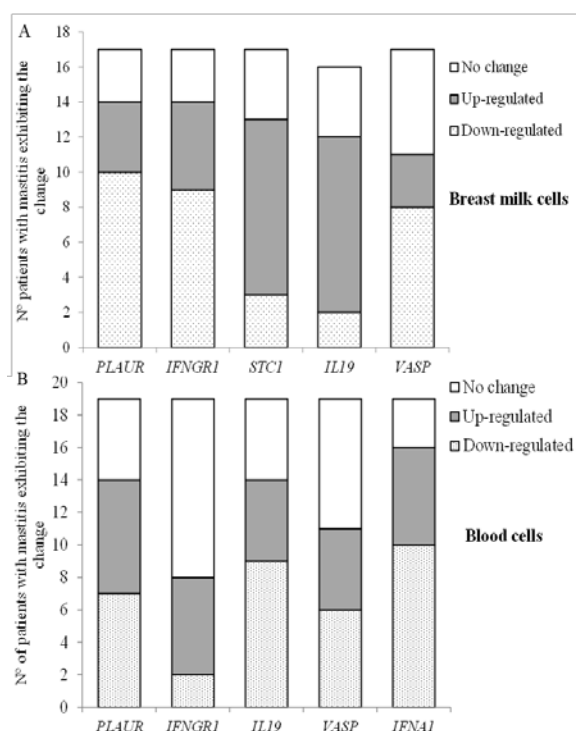
Gene	Gene name	Mean Change by Microarrays (N° of probes, p-values)			Individual Changes by Microarrays		Gene Ontology	Literature search
		Mf vs. Mi	Mi vs. Ci	Cf vs. Ci	Mf vs. Mi (n=7 individuals)	Cf vs. Ci (n=3 individuals)		
<i>STC1</i>	Stanniocalcin 1	↑ (2, p<0.05) ↑ (2, p<0.1)	↓ (4, p<0.15)	NC (4, NS)	↑ (n=6) ↓ (n=1)	↑ (n=1) ↓ (n=2)	Biological Process	Mastitis/ Inflammation/ Cancer/ Breast or Mammary Tissue
<i>PLAUR</i> ( <i>uPAR</i> )	Plasminogen activator, urokinase receptor	↓ (1, p<0.01) ↓ (3, p<0.1) ↓ (1, NS)	↑ (5, NS)	NC (5, NS)	↓ (n=6) ↑ (n=1)	↑ (n=2) ↓ (n=1)	Chemotaxis/ signal transduction/ blood coagulation	Elevated levels of PLAUR found in aggressive breast cancer. Anti-uPAR antibodies were effective at reducing breast tumor burden in vivo (LeBeau et al. 2013). Central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration and angiogenesis in breast cancer (Poettler et al. 2012). The plasminogen activation system has a key role in the regulation of all the phases of the inflammation process (Del Rosso et al. 2008). Induced in udder tissue of heifers inoculated with <i>Streptococcus uberis</i> (de Greeff et al. 2013).
<i>IFNGR1</i>	Interferon gamma receptor 1	↓ (1, p<0.05) ↓ (1, NS)	↑ (1, p<0.1) ↑ (1, NS)	↑ (1, NS) NC (1, NS)	↓ (n=6) ↑ (n=1)	↑ (n=2) 1 NC	Signal transduction/ blood coagulation/ response to virus	Low expression of IFNGR1 leads to a functional blockade of IFN $\gamma$ signaling and is associated with breast cancer (Chen et al. 2012). Antigen-specific inflammation in cows' mammary gland is characterized by overexpression of interleukins and IFN- $\gamma$ (Ramard et al. 2013).
<i>VASP</i>	Vasodilator- stimulated phosphoprotein	↓ (1, p<0.05)	↑ (1, NS)	↓ (1, NS)	↓ (n=5) NC (n=2)	↓ (n=2) 1 NC	Neural tube closure/ actin cytoskeleton organization	Suppression of VASP is associated with TNF- $\alpha$ and HIF-1 $\alpha$ induced inhibition of breast cancer cell adhesion and proliferation (Su et al. 2012). Downregulation of VASP expression inhibits breast cancer cell migration and invasion (Zhang et al. 2009).

**Table 1.-** Genes selected for further analysis by RT-PCR (continue).

Gene	Mean Change by Microarrays (N° of probes, <i>p</i> -values)		Individual Changes by Microarrays		Gene Ontology	Literature search		
<i>IL19</i>	Interleukin-19	↑ (1, <i>p</i> <0.05) ↑ (1, <i>p</i> <0.15)	NC (2, NS)	NC (2, NS)	↑ (n=6) ↓ (n=1)	↑ (n=2) 1 NC	Oxygen and reactive oxygen species metabolism process/immune response/apoptosis/ signal transduction/ interleukin-6 biosynthetic process	IL-19 is produced by monocytes, and activates these cells in an autocrine and paracrine fashion to release the cytokines IL-6, TNF-α, and numerous ROS. Monocyte IL-19 production is downregulated by IFN-γ (Communs et al. 2008). IL-19 has an autocrine effect in breast cancer cells; it promotes cell proliferation and migration (Chen et al. 2013).
<i>IFNA1/13</i>	Interferon alpha-1/13	↑ (1, <i>p</i> <0.05)	NC (1, NS)	↑ (1, NS)	↑ (n=3) NC (n=4)	↑ (n=2) ↓ (n=1)	Defense response/ response to virus	Most tissues and cell types produce IFN-1 when exposed to appropriate pathogen or danger-associated molecular patterns (Rauch et al. 2013). IFN-α1 gene transfer in in vivo models of breast cancer induced neovascularization and tumor growth. Gene therapy with IFN-α1 might be useful for treatment of breast cancer (Indraccolo et al. 2002).
<i>DCD</i>	Dermcidin	↑ (1, <i>p</i> <0.05)	NC (1, NS)	NC (1, NS)	↑ (n=4) NC (n=3)	NC (n=3)	Killing of cells of another organism/ defense response to bacterium	Dermcidin participates in the host defense against <i>Staphylococcus aureus</i> skin infection (Ryu et al. 2014). Dermcidin expression is associated with breast cancer progression (Brauer et al. 2014).

GENE	Breast milk isolated cells Mf vs. Mi (n=17)	
	% Patients	Median [Min, Max]
<i>PLAUR</i>	24% ↑	-1.24 [-5.44, 8.53]
	59% ↓	
<i>IFNGRI</i>	29% ↑	-1.38 [-2.64, 3.27]
	53% ↓	
<i>STC1</i>	59% ↑	1.39 [-4.12, 6.60]
	18% ↓	
<i>IL19</i>	63% ↑	1.32 [-1.56, 5.44]
	13% ↓	
<i>VASP</i>	18% ↑	-1.04 [-3.43, 2.31]
	47% ↓	

**Table 2.** Differential gene expression between day 0 (Mi, initial) and day 21 (Mf, final) of intervention with the probiotic (PS2) in immune cells isolated from breast milk samples of participants with mastitis: Percentage of patients exhibiting up- or down-regulation for each specific gene. Values above 50% were considered as indicators of a trend and are marked in light grey color.



**Figure 4. Results of qPCR in Breast milk and Blood samples.** The graphic represents how is the change in the selected genes in the volunteers of the study, showing no change (white bar), up-regulation (grey bar) or down-regulation (dotted bar). a) represented breast milk samples and b) blood samples.

#### RT-PCR analyses

A number of genes that were found significantly modified in the mammary isolated SC samples following the probiotic consumption in participants with mastitis were selected for further analysis by RT-PCR (Table 1). These genes have been reported to be expressed in mammary tissue or breast cells and involved in inflammation and/or mastitis as well as in cell processes responsive to disease (cell proliferation, adhesion, migration, angiogenesis). A summary of the expression changes for the selected genes in the breast isolated SC ( $n = 17$  samples including those used for the microarrays) are shown in Table 2 and Figure 4. The genes *DCD* and *IFNA1* exhibited very low expression (most Ct values were  $> 35$ ) by RT-PCR in the breast samples. The results further confirmed that *PLAUR* and *IFNGR1* were downregulated and *STC1* and *IL19*

upregulated in a higher percent ( $> 50\%$ ) of the samples examined.

## Discussion

Beneficial effects of probiotics in some human diseases, in special intestinal diseases, have been shown in clinical trials relating these effects to a specific strain. The use of probiotics in mastitis treatment is not new; there is evidence of its efficacy against this disease in previous studies (Jiménez, Fernández et al. 2008, Arroyo, Martín et al. 2010). In these studies, the use of a specific strain to treat mastitis supposed a regression of the symptoms, associated to a reduction of total bacterial counts and somatic cell counts in milk. It is remarkable that the probiotic strain has a translocation from the gut to the mammary gland, called entero-mammary pathway (Fernández, Langa et al. 2013). In this pathway is believed that are involved leukocytes and dendritic cells as bacteria carriers to the different exocrine glandular tissue (Pérez, Doré et al. 2007, Lapthorne, Macsharry et al. 2012). Nevertheless, despite the evidence of this translocation the way to pass to the milk is still unclear.

In this study, *L. salivarius* PS2, a human milk strain, showed an effect on the total bacterial count of milk from women suffering mastitis decreasing the staphylococcal/streptococcal counts (Espinosa-Martos, Jiménez et al., 2016). Women recruited in this study reported a complete or notable improvement after the treatment leading to a voluntary desertion of the intake of ibuprofen and acetaminophen as shown in the metabolomics study of their urine (Vázquez-Fresno, Llorach et al., 2014). To complement these results, a transcriptome analysis was carried out in milk somatic cells with the purpose to show how mammary gland cells respond to the infection and how the probiotic acts over these cells. The existence of a genetic basis for host responses to bacterial mammary infections has been documented in farm animals, but underlying mechanisms and genes

involved are still unknown (Sun, Aswath et al. 2015, Sipka, Klaessig et al. 2014, Swanson, Stelwagen et al. 2009, de Greeff, Zadoks et al. 2013).

Mastitis is not only a problem in women. In farm animals, in special ruminants, mastitis is an endemic disease that is considered to be one of the most frequent and costly diseases in the dairy industry. Due to this incidence, several milk and mammary tissue transcriptomic studies were carried out in farm animals, to try to know the mechanism of this pathology (Bonfont, Toufeer et al. 2011, Cremonesi, Capoferri et al. 2012, Brenaut, Lefevre et al. 2014, Fu, Zhou et al. 2013, Schukken, Gunther et al. 2011, Wellnitz, Bruckmaier 2012, Mazzilli, Piccinini et al. 2015) and how to solve the infection. In these works, the response of the mammary gland in an artificial infection with *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* or *Escherichia coli* was studied. The inflammatory response against an artificial acute mastitis showed the inflammatory genes (cytokines, nuclear factors...) upregulated. In human, the expression of the genes of somatic cells during an acute or sub-acute mastitis have not been studied, previously. In addition, women suffering a sub-acute/subclinical mastitis are often-underrated. To our knowledge, this is the first report of a high-throughput gene expression profiling from human milk of women suffering infectious mastitis before and after a probiotic treatment. We have observed the effect that the probiotic strain *L. salivarius* PS2 exerts on the gene expression in mammary gland while is resolving the breast disbiosis. Among the 2 groups of the study, mastitis one showed a clear change in the genes expression profile, turning over the inflammation gene expression after the probiotic intake, proving the efficacy of *L. salivarius* PS2 in the mastitis treatment at a transcription. Similarly, in the control group, probiotic intake made a strong change in a few gene families, in special upregulation of TGF- $\beta_2$  family. This fact corresponds with the increase of TGF- $\beta_2$  amounts observed when secretory immune profile was

analyzed (Espinosa-Martos, Jiménez et al., 2016). Significantly, this protein has a high impact in infant gut development and favors oral tolerance in breastfed babies (Penttila 2010, Oddy, McMahon 2011). In other study in which was tested a *Lactobacillus reuteri*, there was a reduction in TGF- $\beta_2$  levels in milk (Bottcher, Abrahamsson et al. 2008), suggesting that our effect is strain specific.

In contrast to animal studies, humans have different response to different stimulus and in our study; results gave us a high variability between samples of the volunteers with mastitis to the consumption of the probiotic. Given the heterogeneity of the samples (breast milk-isolated somatic cells from various participants) the clear difference observed in gene expression have to be consider as a true *L. salivarius* PS2 action in mammary gland.

## References

- ANDERSEN, C.L., JENSEN, J.L. and ORNTOF, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*, **64**(15), pp. 5245-5250.
- ANDREAS, N.J., KAMPMANN, B. and MEHRING LE-DOARE, K., 2015. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development*, **91**(11), pp. 629-635.
- ARROYO, R., MARTIN, V., MALDONADO, A., JIMENEZ, E., FERNANDEZ, L. and RODRIGUEZ, J.M., 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **50**(12), pp. 1551-1558.
- BALLARD, O. and MORROW, A.L., 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America*, **60**(1), pp. 49-74.

- BOIX-AMOROS, A., COLLADO, M.C. and MIRA, A., 2016. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Frontiers in microbiology*, **7**, pp. 492.
- BONNEFONT, C.M., TOUFEER, M., CAUBET, C., FOULON, E., TASCA, C., AUREL, M.R., BERGONIER, D., BOULLIER, S., ROBERT-GRANIE, C., FOUCRAS, G. and RUPP, R., 2011. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC genomics*, **12**, pp. 208-2164-12-208.
- BOTTCHER, M.F., ABRAHAMSSON, T.R., FREDRIKSSON, M., JAKOBSSON, T. and BJORKSTEN, B., 2008. Low breast milk TGF-beta2 is induced by *Lactobacillus reuteri* supplementation and associates with reduced risk of sensitization during infancy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, **19**(6), pp. 497-504.
- BRAUER HA, D'ARCY M, LIBBY TE, THOMPSON HJ, YASUI YY, HAMAJIMA N, LI CI, TROESTER MA, and LAMPE PD. (2014). Dermcidin expression is associated with disease progression and survival among breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 144(2):299-306.
- BRENAUT, P., LEFEVRE, L., RAU, A., LALOE, D., PISONI, G., MORONI, P., BEVILACQUA, C. and MARTIN, P., 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary research*, **45**, pp. 16-9716-45-16.
- CHANG AC, DOHERTY J, HUSCHTSCHA LI, REDVERS R, RESTALL C, REDDEL RR, and ANDERSON RL. (2014). STC1 expression is associated with tumor growth and metastasis in breast cancer. *Clin Exp Metastasis*.
- CHEN C, GUO L, SHI M, HU M, HU M, YU M, WANG T, SONG L, SHEN B, QIAN L, and GUO N. (2012). Modulation of IFN- $\gamma$  receptor 1 expression by AP-2 $\alpha$  influences IFN- $\gamma$  sensitivity of cancer cells. *Am J Pathol.* 180(2):661-71.
- CHEN YY, LI CF, YE H CH, CHANG MS, and HSING CH.(2013). Interleukin-19 in breast cancer. *Clin Dev Immunol.* 294320. doi: 10.1155/2013/294320.
- COLLADO, M.C., DELGADO, S., MALDONADO, A. and RODRIGUEZ, J.M., 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in applied microbiology*, **48**(5), pp. 523-528.
- CREMONESI, P., CAPOFERRI, R., PISONI, G., DEL CORVO, M., STROZZI, F., RUPP, R., CAILLAT, H., MODESTO, P., MORONI, P., WILLIAMS, J.L., CASTIGLIONI, B. and STELLA, A., 2012. Response of the goat mammary gland to infection with *Staphylococcus aureus* revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. *BMC genomics*, **13**, pp. 540-2164-13-540.
- DE GREEFF, A., ZADOKS, R., RUULS, L., TOUSSAINT, M., NGUYEN, T.K., DOWNING, A., REBEL, J., STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N. and SMITH, H., 2013. Early host response in the mammary gland after experimental *Streptococcus uberis* challenge in heifers. *Journal of dairy science*, **96**(6), pp. 3723-3736.
- DEL ROSSO M, FIBBI G, PUCCI M, MARGHERI F, and SERRATI S. (2008). The plasminogen activation system in inflammation. *Front Biosci.* 13:4667-86.
- ESPINOSA-MARTOS, I., JIMENEZ, E., DE ANDRES, J., RODRIGUEZ-ALCALA, L.M., TAVAREZ, S., MANZANO, S., FERNANDEZ, L., ALONSO, E., FONTECHA, J. and RODRIGUEZ, J.M., 2016. Milk and blood biomarkers associated to the clinical efficacy of a probiotic for the treatment of infectious mastitis. *Beneficial microbes*, **7**(3), pp. 305-318.
- FERNANDEZ, L., LANGA, S., MARTIN, V., MALDONADO, A., JIMENEZ, E., MARTIN, R. and RODRIGUEZ, J.M., 2013. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research*, **69**(1), pp. 1-10.
- FU, Y., ZHOU, E., LIU, Z., LI, F., LIANG, D., LIU, B., SONG, X., ZHAO, F., FEN, X., LI, D., CAO, Y., ZHANG, X., ZHANG, N. and YANG, Z., 2013. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, **155**(4), pp. 245-252.
- GOLDSMITH, F., O'SULLIVAN, A., SMILOWITZ, J.T. and FREEMAN, S.L., 2015. Lactation and Intestinal Microbiota: How Early Diet Shapes the Infant Gut. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **20**(3-4), pp. 149-158.

- GUEIMONDE, M., LAITINEN, K., SALMINEN, S. and ISOLAURI, E., 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, **92**(1), pp. 64-66.
- HUANG DA, W., SHERMAN, B.T. and LEMPICKI, R.A., 2009a. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic acids research*, **37**(1), pp. 1-13.
- HUANG DA, W., SHERMAN, B.T. and LEMPICKI, R.A., 2009b. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, **4**(1), pp. 44-57.
- HUNT, K.M., FOSTER, J.A., FORNEY, L.J., SCHUTTE, U.M., BECK, D.L., ABDO, Z., FOX, L.K., WILLIAMS, J.E., MCGUIRE, M.K. and MCGUIRE, M.A., 2011. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS one*, **6**(6), pp. e21313.
- INDRACCOLO S, GOLA E, ROSATO A, MINUZZO S, HABELER W, TISATO V, RONI V, ESPOSITO G, MORINI M, ALBINI A, NOONANDM, FERRANTINI M, AMADORI A, and CHIECO-BIANCHI L. (2002). Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon-alpha(1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Ther.*, **9**(13):867-78.
- JIMENEZ, E., FERNANDEZ, L., MALDONADO, A., MARTIN, R., OLIVARES, M., XAUS, J. and RODRIGUEZ, J.M., 2008. Oral administration of Lactobacillus strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(15), pp. 4650-4655.
- LAPTHORNE, S., MACSHARRY, J., SCULLY, P., NALLY, K. and SHANAHAN, F., 2012. Differential intestinal M-cell gene expression response to gut commensals. *Immunology*, **136**(3), pp. 312-324.
- LEBEAU AM, DURISETI S, MURPHY ST, PEPIN F, HANN B, GRAY JW, VANBROCKLIN HF, and CRAIK CS. (2013). Targeting uPAR with antagonistic recombinant human antibodies in aggressive breast cancer. *Cancer Res.* **73**(7):2070-81.
- LIVAK, K.J. and SCHMITTGEN, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **25**(4), pp. 402-408.
- MARTÍN, R., JIMÉNEZ, E., HEILIG, H., FERNÁNDEZ, L., MARÍN, M.L., ZOETENDAL, E.G. and RODRÍGUEZ, J.M., 2009. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**(4), pp. 965-969.
- MAZZILLI, M., PICCININI, R., SCALI, F. and ZECONI, A., 2015. Pattern characterization of genes involved in non-specific immune response in Staphylococcus aureus isolates from intramammary infections. *Research in veterinary science*, **103**, pp. 54-59.
- MEDIANO, P., FERNANDEZ, L., JIMENEZ, E., ARROYO, R., ESPINOSA-MARTOS, I., RODRIGUEZ, J.M. and MARIN, M., 2017. Microbial Diversity in Milk of Women With Mastitis: Potential Role of Coagulase-Negative Staphylococci, Viridans Group Streptococci, and Corynebacteria. *Journal of human lactation : official journal of International Lactation Consultant Association*, **33**(2), pp. 309-318.
- ODDY, W.H. and MCMAHON, R.J., 2011. Milk-derived or recombinant transforming growth factor-beta has effects on immunological outcomes: a review of evidence from animal experimental studies. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **41**(6), pp. 783-793.
- PENTTILA, I.A., 2010. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *The Journal of pediatrics*, **156**(2 Suppl), pp. S21-5.
- PEREZ, P.F., DORE, J., LECLERC, M., LEVENEZ, F., BENYACOU, J., SERRANT, P., SEGURA-ROGGERO, I., SCHIFFRIN, E.J. and DONNET-HUGHES, A., 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, **119**(3), pp. e724-32.
- POETTTLER M, UNSELD M, MIHALY-BISON J, UHRIN P, KOBAN F, BINDER BR, ZIELINSKI CC, and PRAGER GW. (2012). The urokinase receptor (CD87) represents a central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration. *Thromb Haemost.* **108**(2):357-66.
- RAINARD P, CUNHA P, BOUGARN S, FROMAGEAU A, ROSSIGNOL C,



- GILBERT FB, and BERTHON P (2013). T Helper 17-Associated Cytokines Are Produced during Antigen-Specific Inflammation in the Mammary Gland. *PLOS One* 8(5): e63471
- RAUCH I, MÜLLER M, and DECKER T. (2013). The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAKSTAT*, 1;2(1):e23820.
- RYU S, SONG PI, SEO CH, CHEONG H, and PARK Y (2014) Colonization and infection of the skin by *S. aureus*: immune system evasion and the response to cationic antimicrobial peptides. *Int J Mol Sci.* 16;15(5):8753-72.
- SCHUKKEN, Y.H., GUNTHER, J., FITZPATRICK, J., FONTAINE, M.C., GOETZE, L., HOLST, O., LEIGH, J., PETZL, W., SCHUBERTH, H.J., SIPKA, A., SMITH, D.G., QUESNELL, R., WATTS, J., YANCEY, R., ZERBE, H., GURJAR, A., ZADOKS, R.N., SEYFERT, H.M. and MEMBERS OF THE PFIZER MASTITIS RESEARCH CONSORTIUM, 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*, **144**(3-4), pp. 270-289.
- SCOTT COMMINS S, STEINKE JW, and BORISH L (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J Allergy Clin Immunol*, 121, 5, 1108-1111.
- SIPKA, A., KLAESSIG, S., DUHAMEL, G.E., SWINKELS, J., RAINARD, P. and SCHUKKEN, Y., 2014. Impact of intramammary treatment on gene expression profiles in bovine *Escherichia coli* mastitis. *PloS one*, **9**(1), pp. e85579.
- STELWAGEN, K. and SINGH, K., 2014. The role of tight junctions in mammary gland function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **19**(1), pp. 131-138.
- SU K, TIAN Y, WANG J, SHI W, LUO D, LIU J, TONG Z, WU J, ZHANG J, and WEI L. (2012). HIF1 $\alpha$  acts downstream of TNF $\alpha$  to inhibit vasodilator stimulated phosphoprotein expression and modulates the adhesion and proliferation of breast cancer cells. *DNA Cell Biol.* 31(6):107887.
- SUN, J., ASWATH, K., SCHROEDER, S.G., LIPPOLIS, J.D., REINHARDT, T.A. and SONSTEGARD, T.S., 2015. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC genomics*, **16**, pp. 806-015-2044-9.
- SWANSON, K.M., STELWAGEN, K., DOBSON, J., HENDERSON, H.V., DAVIS, S.R., FARR, V.C. and SINGH, K., 2009. Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. *Journal of dairy science*, **92**(1), pp. 117-129.
- VAZQUEZ-FRESNO, R., LLORACH, R., MARINIC, J., TULIPANI, S., GARCIA-ALOY, M., ESPINOSA-MARTOS, I., JIMENEZ, E., RODRIGUEZ, J.M. and ANDRES-LACUEVA, C., 2014. Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. *Pharmacological research*, **87**, pp. 160-165.
- WELLNITZ, O. and BRUCKMAIER, R.M., 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, **192**(2), pp. 148-152.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) and DEPARTMENT OF CHILD AND ADOLESCENT HEALTH AND DEVELOPMENT, 2000. *Mastitis: Causes and Management*. Geneva, Switzerland.: WHO reference No. WHO/FCH/CAH/00.13.
- YEUNG BH, LAW AY, and WONG CK. (2012). Evolution and roles of stanniocalcin. *Mol Cell Endocrinol.* 349(2):272-80.
- ZHANG Y, HAN G, FAN B, ZHOU Y, XUAN ZHOU X, WEI L, and ZHANG J (2009). Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate down-regulates VASP expression and inhibits breast cancer cell migration and invasion by attenuating Rac1 activity. *European Journal of Pharmacology* 606, 172-179.

**Supplementary table 1.** Demographic characteristics from the study women.

	Mastitis (n = 24)		Healthy (n = 8)		p value (KW)
	Median	IQR	Median	IQR	
Feeding Days	49.5	30 - 76.50	107.5	88 - 153.75	0.004045
Mother's age	33	31.75 - 35.25	36	33.75 - 36.50	0.1314
Sibling's number	1	1.00 - 2.00	2	1.75 - 2.00	0.03788
	Frequency	(%)	Frequency	(%)	p value
Delivery type					
C-section	4	16,7	0	0,0	0.993
Vaginal	20	83,3	8	100,0	
Antibiotic treatment					
Yes	8	33,3	1	12,5	0.2774
No	16	66,7	7	87,5	
Feeding days					
18 - 46	11	45,8	0	0,0	0.02974
46 - 90	8	33,3	3	37,5	
90 - 450	5	20,8	5	62,5	
Mother's age					
27 - 32.3	10	41,7	1	12,5	0.1305
32.3 - 35.7	8	33,3	2	25,0	
35.7 - 41	6	25,0	5	62,5	
Siblings					
1	17	70,8	2	25,0	0.0847
> 1	7	29,2	6	75,0	

**Supplementary Table 2.-** Genes selected for RT-PCR validation and Applied Biosystems (ABI) TaqMan assay identity.

ABI Assay ID	RefSeq	Approved <sup>a</sup> Gene symbol	Approved <sup>a</sup> Gene name
Hs00174970_m1	NM_003155.2	<i>STC1</i>	Stanniocalcin 1
Hs00958880_m1	NM_001005376 NM_001005377 NM_002659	<i>PLAUR</i>	Plasminogen activator, urokinase receptor
Hs00988304_m1	NM_000416.2	<i>IFNGR1</i>	Interferon gamma receptor 1
Hs01100128_m1	NM_003370.3	<i>VASP</i>	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
Hs00604657_m1	NM_153758.2	<i>IL19</i>	Interleukin 19
Hs04190680_gH	NM_006900.3 NM_024013.2	<i>IFNA1</i> <i>IFNA13</i>	Interferon alpha-1/13
Hs00364976_m1	NM_053283.2	<i>DCD</i>	Dermcidin
<i>Reference genes</i>			
Hs02758991_g1	NM_001256799.1 NM_002046.4	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
Hs00427620_m1	NM_001172085.1 NM_003194.4	<i>TBP</i>	TATA box binding protein
Hs00172187_m1	NM_000937.4	<i>POLR2A</i>	Polymerase (RNA) II Subunit A

<sup>a</sup>: HGNC, Hugo Gene Nomenclature Committee.

**Supplementary Table 3.-** Functional analysis: summary of top cellular and molecular functions (by Gene Ontology terms analysis) and pathways (by Partek Genomic Suite analysis) enriched in DE upregulated and downregulated genes in participants with and without mastitis before and after treatment with the probiotic.

		Mi vs. Ci	Mf vs. Mi	Cf vs. Ci
Probes upregulated (FC >1.2) and downregulated (FC <-1.2) (p-value <0.05)	G.O. terms Analysis using DAVID (p-value<0.05)	<p><i>Cluster 1</i> (Downregulated, 1068 probes) RNA splicing, transport and localization Purine ribonucleoside monophosphate biosynthetic process Glutamine metabolic process Membrane fusion, protein targeting to membrane, inner mitochondrial membrane organization Mitotic spindle organization</p>	<p><i>Cluster 1</i> (Downregulated, 81 probes) Positive regulation of cell death, induction of apoptosis Regulation of transcription</p>	<p><i>Cluster 1</i> (Downregulated, 336 probes) Regulation of protein catabolic process, negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity during mitotic cell cycle RNA splicing, transport and localization DNA replication Regulation of lipid metabolic process Regulation of cell cycle and cell growth</p>
		<p><i>Cluster 2</i> (Upregulated, 309 probes) Immune response Lymphocyte, T-cell, natural killer cell activation, positive regulation of alpha-beta T cell differentiation, regulation of defense response to virus Response to nutrient levels and extracellular stimulus Regulation of transcription and translation Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway Positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolic and phosphorylation processes Regulation of cell proliferation, cell adhesion and angiogenesis</p>	<p><i>Cluster 2</i> (Upregulated, 387 probes) Amino acid catabolic process, glycine metabolic process GPI anchor biosynthetic process, phosphoinositide metabolic process Transmembrane transport, dicarboxylic acid transport Morphogenesis</p>	<p><i>Cluster 2</i> (Upregulated, 575 probes) Cell adhesion and junction organization, cell-substrate junction assembly Response to oxygen levels Regulation of signal transduction, regulation of transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway, regulation of transforming growth factor-beta2 production, regulation of small GTPase mediated signal transduction Positive regulation of cell morphogenesis involved in differentiation, positive regulation of epithelial to mesenchymal transition Protein processing, maturation by peptide bond cleavage, glutamine family amino acid catabolic process, SMAD protein nuclear translocation Cell cycle arrest, negative regulation of cell proliferation, negative regulation of cell communication, cell death, regulation of caspase activity, negative regulation of cell development, cell-cell signaling, positive regulation of cell differentiation Regulation of lymphocyte apoptosis, regulation of T cell activation potassium ion transport</p>
	Pathways Analysis using Partek Genomics Suite (uppermost altered inflammation and cell growth/survival related pathways)	<p>Systemic lupus erythematosus PI3K-Akt signaling pathway Focal adhesion Rap1 signaling pathway Natural killer cell mediated cytotoxicity Chemokine signaling pathway Herpes simplex infection Cytokine-cytokine receptor interaction</p>	<p>PI3K-Akt signaling pathway Systemic lupus erythematosus Cytokine-cytokine receptor interaction Influenza A Jak-STAT signaling pathway Tuberculosis Natural killer cell mediated cytotoxicity Herpes simplex infection Focal adhesion Rap1 signaling pathway Toll-like receptor signaling pathway Leukocyte transendothelial migration</p>	<p>HTLV-I infection PI3K-Akt signaling pathway Cytokine-cytokine receptor interaction TGF-beta signaling pathway Rap1 signaling pathway Herpes simplex infection Natural killer cell mediated cytotoxicity Focal adhesion</p>

**Supplementary table 4.-** Pathways from KEGG in each group.

## Healthy group

Pathway Name	P-value
TGF-beta signaling pathway	0.002
Spliceosome	0.025
ABC transporters	0.040
Cell cycle	0.041
Proteasome	0.043

## Mastitis vs Healthy group

Pathway Name	P-value
Alcoholism	$8.08 \times 10^{-5}$
Systemic lupus erythematosus	$2.09 \times 10^{-4}$
Antigen processing and presentation	$4.12 \times 10^{-4}$
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	0.002
Viral carcinogenesis	0.003
Fatty acid metabolism	0.006
mRNA surveillance pathway	0.006
Protein processing in endoplasmic reticulum	0.008
Fatty acid degradation	0.012
D-Glutamine and D-glutamate metabolism	0.018
Spliceosome	0.019
Progesterone-mediated oocyte maturation	0.026
Hedgehog signaling pathway	0.026
Gastric acid secretion	0.028
Insulin secretion	0.029
Estrogen signaling pathway	0.029
Ribosome biogenesis in eukaryotes	0.033
Adipocytokine signaling pathway	0.048

## Mastitis group

Pathway Name	P-value
Alcoholism	$8.68 \times 10^{-4}$
Systemic lupus erythematosus	0.001
Protein digestion and absorption	0.004
Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	0.022
Thyroid hormone synthesis	0.026
Autoimmune thyroid disease	0.032
Arginine and proline metabolism	0.043
Regulation of autophagy	0.044

Mastitis vs Healthy group (only FC 2 and without p-value)

Pathway Name	P-value
<i>Staphylococcus aureus</i> infection	$1.16 \times 10^{-15}$
Leishmaniasis	$3.38 \times 10^{-11}$
Osteoclast differentiation	$4.86 \times 10^{-10}$
Rheumatoid arthritis	$7.85 \times 10^{-8}$
Complement and coagulation cascades	$2.57 \times 10^{-6}$
Graft-versus-host disease	$2.68 \times 10^{-6}$
Cytokine-cytokine receptor interaction	$2.39 \times 10^{-5}$
Phagosome	$3.65 \times 10^{-5}$
Tuberculosis	$4.00 \times 10^{-5}$
Pertussis	$4.41 \times 10^{-5}$
Chemokine signaling pathway	$7.30 \times 10^{-5}$
Systemic lupus erythematosus	$1.78 \times 10^{-4}$
Natural killer cell mediated cytotoxicity	$1.90 \times 10^{-4}$
Cell adhesion molecules (CAMs)	$2.97 \times 10^{-4}$
Type I diabetes mellitus	$3.51 \times 10^{-4}$
Malaria	$7.22 \times 10^{-4}$
TNF signaling pathway	$7.54 \times 10^{-4}$
Mineral absorption	$8.96 \times 10^{-4}$
Allograft rejection	0.001
Antigen processing and presentation	0.002
Viral myocarditis	0.002
Influenza A	0.002
Herpes simplex infection	0.003
Amoebiasis	0.003
Asthma	0.004
Autoimmune thyroid disease	0.006
Legionellosis	0.007
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0.008
Prion diseases	0.009
Toll-like receptor signaling pathway	0.01
HTLV-I infection	0.013
Hematopoietic cell lineage	0.014
Inflammatory bowel disease (IBD)	0.016
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.016
Transcriptional misregulation in cancer	0.019
Epithelial cell signaling in <i>Helicobacter pylori</i> infection	0.019
Intestinal immune network for IgA production	0.02
NOD-like receptor signaling pathway	0.038
African trypanosomiasis	0.04
Salmonella infection	0.043
Glycine, serine and threonine metabolism	0.049

IV.4. Physiological translocation of lactic acid bacteria during pregnancy contributes to the composition of the human milk microbiota

Andrés J, Jiménez E, Chico-Calero I, Fernández L, Fresno M, Rodríguez JM.

Enviado a *Nutrients* en 11 de octubre de 2017.







Article

# Physiological translocation of lactic acid bacteria during pregnancy contributes to the composition of the human milk microbiota

Javier de Andrés<sup>1†</sup>, Esther Jiménez<sup>1†\*</sup>, Isabel Chico-Calero<sup>2</sup>, Manuel Fresno<sup>2</sup>, Leónides Fernández<sup>1</sup>, Juan Miguel Rodríguez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Nutrition, Food Science and Food Technology, Complutense University of Madrid, Spain

<sup>2</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Universidad Autónoma de Madrid (UAM), and Instituto Sanitario de Investigación Princesa, Madrid, Spain.

<sup>†</sup>These two authors share the first authorship.

<sup>\*</sup>Author to whom correspondence should be addressed. <sup>\*</sup>Current address: ProbiSearch S.L.U., Tres Cantos, Madrid, Spain

Received: date; Accepted: date; Published: date

**Abstract:** The human milk microbiota is a complex and diverse ecosystem which seems to play a relevant role in mother-to-infant transmission of microorganisms during early life. Bacteria present in human milk may arise from different sources, recent studies suggest that at least some of them may be originally present in the maternal digestive tract and may reach the mammary gland through an endogenous route during pregnancy and lactation. The objective of this work was to elucidate whether some lactic acid bacteria are able to translocate and colonize the mammary gland and milk. For this purpose, two lactic acid bacteria strains (*Lactococcus lactis* MG1614 and *Lactobacillus salivarius* PS2) were transformed with a plasmid containing the *lux* genes and, subsequently, the transformed strains were orally administered to pregnant and lactating mice. The murine model allowed the visualization, isolation and PCR detection of the transformed bacteria in different body locations, including mammary tissue and milk, reinforcing the hypothesis that physiological translocation of maternal bacteria during pregnancy and lactation may contribute to the composition of the mammary and milk microbiota.

**Keywords:** human milk; translocation; *Lactobacillus salivarius*; *lux*; bioluminescence; pregnancy; lactation

## 1. Introduction

Human milk contains microorganisms that, together with other milk components, play a pivotal role in the early colonization of the infant gut. The use of diverse culture-dependent or-independent techniques has allowed either the isolation or detection of a wide spectrum of commensal bacteria in milk samples provided by healthy women worldwide [1]. Most research efforts have been focused on lactobacilli and bifidobacterial isolates because of their potential to be used as probiotics [2].

Traditionally, presence of bacteria in human milk was related to contamination from the mother's skin or infant's oral cavity [2]. In addition, bacterial translocation from the digestive tract of healthy women has been proposed as a source of bacteria for the mammary gland during late pregnancy and lactation [3]. In fact, physiological translocation of commensal bacteria from the gut to different mucosal surfaces has already been shown *in vitro* and *in vivo* through a mechanism involving complex interactions between bacteria, epithelial cells and immune cells (including dendritic cells and macrophages) [3,4]. Previous studies have reported that oral administration of

some lactobacilli strains to lactating women leads to their presence in milk [5,6]. However, more mechanistic studies studying potential bacterial transfer from the gut to the mammary glands of healthy hosts are required to further confirm such findings.

Bioluminescent whole-body imaging allows rapid and real-time monitoring of bacteria *in vivo*. This system captures photons of light emitted by naturally luminescent bacteria or by those that have been genetically manipulated to produce bioluminescence. The bioluminescence reaction involves a luciferase-catalyzed intracellular oxidation of a long-chain fatty aldehyde (R-CHO) together with a concomitant reduction of flavin mononucleotide (FMNH<sub>2</sub>). Such reactions lead to the generation of blue-green light, as follows: FMNH<sub>2</sub> + O<sub>2</sub> + R-CHO → FMN + H<sub>2</sub>O + R-COOH + Light (~ 495 nm). The *lux* operon (*luxABCDE*) contains the genetic determinants for bioluminescence and includes the structural genes (*luxA* and *luxB*) coding for the two subunits (α and β, respectively) of the luciferase enzyme and, also, three additional genes (*luxC*, *D*, and *E*) encoding the fatty acid reductase complex responsible for fatty aldehyde synthesis [7].

Bioluminescence imaging has successfully demonstrated *in vivo* translocation of pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* in mice [8–10], and persistence of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus plantarum* strains in the murine gastrointestinal tract [11]. In addition, translocation of bioluminescent bifidobacteria from the gastrointestinal tract of mice, and their subsequent selective recruitment by tumoral cells, have been shown using such approach [12]. In this context, the objective of this work was to obtain bioluminescent lactic acid bacteria (LAB) strains to provide *in vivo* evidence of their physiological translocation in mice during late pregnancy and lactation.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Bacterial strains and media

The LAB strains used in this work as recipients for the *lux* genes were *Lactococcus lactis* MG1614 [13] and *Lactobacillus salivarius* PS2, a probiotic strain originally isolated from human milk [14–16]. *L. lactis* MG1614 was routinely grown in M17 (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 0.5 % (w/v) glucose (GM17 medium) and incubated at 30 °C, while *L. salivarius* PS2 was grown in Man, Rogosa and Sharp (MRS) (Oxoid) medium and incubated at 37 °C. *Escherichia coli* competent cells were purchased from Bioline (BIO-85027; Bioline Reagents Ltd., London). *E. coli* was grown in Luria Bertani (LB) medium and incubated at 37 °C. When required, erythromycin (Em) (Sigma-Aldrich) was added to the cultures at the following concentrations: 150 µg mL<sup>-1</sup> for *E. coli*, 2.5 µg mL<sup>-1</sup> for *L. lactis* MG1614 and 5 µg mL<sup>-1</sup> for *L. salivarius* PS2. Previously, the erythromycin resistance of *L. salivarius* PS2 had been tested in MRS broth containing Em concentrations ranging from 0.25 to 5 µg mL<sup>-1</sup> at 37 °C for 24 h and bacterial growth was detected by measuring the OD<sub>600</sub> of the cultures.

### 2.2 Construction of pMG36e::luxAB and pMG36e::luxABCDE

Plasmid pXen-5 (XenogenBioware™) was used as template to amplify the *luxABCDE* operon using primers XAF1/XBR1 (which generate a DNA fragment containing only the structural genes *luxAB*) and XAF1/XER2 (which generate a DNA fragment containing the complete *luxABCDE* operon) [17]. However, primers XAF1/XBR1 were modified to add restriction sites *SacI*/*SmaI* and *SacI*/*SalI*, respectively, at the ends of the amplicons (Table 1). PCR were performed using Phusion Hot Start II DNA High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) with the following conditions: 98 °C for 30 s; 35 cycles at 98 °C for 10 s, 72 °C for 1 min, 72 °C for 5 s; and finally, 72 °C for 5 min. PCR products were purified using Sure Clean Plus (Bioline) following manufacturer instructions.

After digestion of the vector (plasmid pMG36e) with the corresponding enzymes (New England Biolabs. *SmaI*, at 25 °C; *SacI* and *SalI* at 37 °C; all incubations were overnight), ligations were performed overnight at 16 °C with T4 DNA ligase (Roche, Mannheim, Germany) to generate plasmids pMG36e::luxAB and pMG36e::luxABCDE, respectively. Plasmid pMG36e is a 3.6 kb expression vector carrying an erythromycin resistance gene and the strong P32 promoter [18]. Both plasmids were separately introduced into competent cells of *E. coli* (BIO-85027; Bioline), following

the manufacturer's instructions. Cells were plated on LB plates supplemented with Em(150 µg mL<sup>-1</sup>) in order to select for transformants.

**Table 1.** Primers used in this study for the PCR detection of *lux* genes.

Name	Sequence (5'-3')	Reference or source
XAF1	CCC CGA GCT CAT GAA GCA AGA GGA GGA CTC TCT ATG	Modified from [17]
XBR1	GGC CCC GGG TTA GGT ATA TTC CAT GTG GTA C	Modified from [17]
XAF1	CCC CGA GCT CAT GAA GCA AGA GGA GGA CTC TCT ATG	Modified from [17]
XER2	GGC GGC GTC GAC TTA ACT ATC AAA CGC TTC GGT TA	Modified from [17]
lux1280	ACG CCG CAG GAA TGT ATT GA	This study
lux1732	TAT GGC GAC AGG ATG ATG AG	This study
lux4807	GTC AAT GAA CGC CGA ATG AG	This study
lux5068	GTC ACT ACT GTC AGG CAC AC	This study

### 2.3 Transformation of *L. lactis* MG1614 and *Lb. salivarius* PS2

Both plasmids were extracted from *E. coli* transformed cells using the Qiagen plasmid mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and electroporated into *L. lactis* MG1614 cells as described previously [19]. After electroporation, *L. lactis* cells were plated on GM17 supplemented with Em (2.5 µg mL<sup>-1</sup>) and incubated at 30 °C for 48 h. Subsequently, both plasmids (containing P32-*luxAB* and P32-*luxABCDE*, respectively) were isolated from the previously transformed *L. lactis* MG1614 cells and electroporated into *L. salivarius* PS2 competent cells, which had been obtained as previously described [20]. Then, bacterial cells were plated on MRS plates supplemented with Em (5 µg mL<sup>-1</sup>) and incubated at 37 °C for 48 h. The stability of the recombinant plasmids was assayed by daily sub-culturing of the recombinant strains in non-selective media during 7 consecutive days. Aliquots of each subculture were plated on selective (Em-supplemented MRS) and non-selective (MRS) agar plates [21]. Plasmid maintenance was determined by comparing the numbers of colonies that grew on both types of media.

Presence of the plasmids in the transformant cells was confirmed by PCR. Primers lux1280F/lux1732R allow the amplification of a 452 bp fragment located between *luxA* and *luxB* genes while primers lux4807F/lux5068R were designed to amplify a 261 bp fragment between *luxD* and *luxE* genes (Table 1). PCR were performed using My Taq™ Red DNA Polymerase (Bioline) and the following conditions: 94 °C for 4 min; 25 cycles at 94 °C for 30 s, 53 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; and, finally 72 °C for 5 min. The amplified fragments were visualized by electrophoresis in a 1.2 % agarose gel after 90 min at 90 V.

### 2.4 Bioluminescence assay

Bioluminescence assays were performed in collaboration with the Biolum Lab of the "Red de Laboratorios de la Comunidad de Madrid". Production of bioluminescence by the bacterial cultures was measured directly in broth medium (1 mL) with a luminometer (Biocounter® M1500 Lumacbv, Landgraaf, The Netherlands), and the bioluminescence was expressed as Relative Light Units (RLUs). Presence of bioluminescent signals was also analyzed on the surface of agar plates using the IVIS 100 imaging system (*In Vivo* Imaging System, Xenogen, PerkinElmer, Hopkinton, MA, USA), which consists of a cooled charge-coupled-device camera mounted on a light-tight specimen chamber. The signal intensity was quantified as photon counts per second (p/s).

### 2.5 In vivo translocation model

10-week-old pregnant Balb/c mice were used to assess the potential *in vivo* translocation of the transformed *L. lactis* and *L. salivarius* strains. Animals were kept in the Animal Facility of Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBM-CSIC, Madrid, Spain), and housed individually (one pregnant mouse per cage) in 1264C Eurostandard Type II cages (26.7 × 20.7 × 14.0 cm - floor area 370 cm<sup>2</sup>, Tecniplast, Buguggiate, VA, Italy) with bedding, food (Diet 2018, Harlan, Italy) and water available *ad libitum*, under a temperature (22°C) and light-controlled (12 h) cycle. All experimental procedures complied to the principles of good laboratory animal care, and were carried out in compliance with national legislation following the EU-Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes, and were approved by the ethics committee for animal experimentation and the Animal Welfare Body of CBM/Complutense University of Madrid, Spain). All adequate measures were taken to minimize animal pain or discomfort.

Bacterial strains were grown overnight in GM17 supplemented with Em (2.5 µg ml<sup>-1</sup>) at 32°C (*L. lactis* cells) or MRS supplemented with Em (5 µg ml<sup>-1</sup>) at 37°C (*L. salivarius* cells). Cells were harvested by centrifugation (18,800×g for 10 min at 4°C) and the pellet was resuspended in a mixture of 10% skimmed milk with 10% of 2.5M sucrose. The mix was dispensed as single-doses (200 µL, ~10<sup>9</sup> CFU/dose), lyophilized and kept at -20°C until their administration to mice. The stability of the doses was assessed weekly by plate count on GM17 (Em: 2.5 µg ml<sup>-1</sup>) or MRS (Em: 5 µg ml<sup>-1</sup>) agar plates.

Test mice (n=6) received a daily dose (at the same time each day) of transformed *L. lactis* (n=2) or *L. salivarius* (n=4; two pregnant and two non-pregnant females) intragastrically via oral gavage until delivery (~20 days). Control mice (n=5) received a daily dose (200 µL) of the probiotic matrix (10% skimmed milk with 10% of 2.5 M sucrose) also by intragastric administration.

At day 15 of pregnancy and after delivery, *in vivo* bioluminescence imaging of the mice was performed using the multimodal IVIS 100 imaging system described above. For this purpose, mice were anesthetized with 2% isoflurane and placed into the camera chamber, where a controlled flow of 1.5% isoflurane-supplemented air was administered through a gas anesthesia system. Bioluminescence was quantified as p/s using the Living Image® software (Caliper Life Sciences).

At the end of the assay, the female mice and their offspring (before weaning) were euthanized using a mixture of CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> according to the EU-guidelines and necropsies performed under sterile conditions. Samples of feces, milk, urine, blood (EDTA tubes) and biopsies of intestine (large and small), stomach, liver, spleen, kidneys, mammary glands, uterus, Peyer's patches, and mesenteric nodes were collected and stored at 4°C for microbiological and microscopy-based analysis.

To evaluate potential translocation of the transformed strains from the gastrointestinal tract to different tissues, the biological samples (biopsies, urine, milk and feces) were (when required) homogenized in peptone water and decimal serial dilutions were spread on selective GM17 (Em: 2.5 µg ml<sup>-1</sup>) or MRS (Em: 5 µg ml<sup>-1</sup>) agar plates.

Biopsies were fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde and 2.5% (v/v) glutaraldehyde (EMS) in PBS pH 7.2 for 4 h at 4°C. Blood was centrifuged (620×g for 20 minutes 4°C), to collect the cells and the pellet was embedded in an agarose matrix before fixing in paraformaldehyde and glutaraldehyde. The samples were washed with cold sterile PBS for 20 minutes at least 4 times. Biopsies were then post-fixed with 1% (w/v) EM grade osmium tetroxide solution for 90 min at room temperature. This was followed by washing with sterile deionized water 4 times every 15 min and a complete dehydration of the specimens in a series of increasing acetone concentrations (30, 50, 70, 80, 90, 95 and 100%). The samples were infiltrated and embedded gradually in epoxy resin. Ultrathin sections were obtained in an Ultracut E microtome (Reichert Jung) and stained with 2% uranyl acetate followed by Reynold's lead citrate. Electron micrographs were obtained with a JEOL 1010 electron microscope at 100 kV and equipped with a CCD megaview camera at the Centro Nacional de Microscopía (Complutense University of Madrid, Spain).

## 2.6 Statistics analysis: sample size calculation

The recommended number of animals included in this trial was determined by using the G\*Power 3.1.9.2 program [22], and previous results obtained after oral administration of a



genetically-labelled *Enterococcus faecium* strain to pregnant mice [23]. The minimum value for the frequency of detection of the *lux*-labelled strain in the experimental group was estimated to be 80%, while it was not expected to be found in the control group. The minimum sample size was estimated to be 12 animals, using a 1:1 allocation ratio, and considering a one-tailed test, a 5% alpha level, and a statistical power of 90% to demonstrate a significant difference. Since one mouse in the control group was lost (a mouse that did not become pregnant) and the real proportion of animals containing *lux*-labelled *Lactococcus* in the experimental group was higher than 80%, a *post hoc* analysis was performed. This analysis confirmed that the achieved power was higher (>99%) than the value that had been selected initially for the calculation.

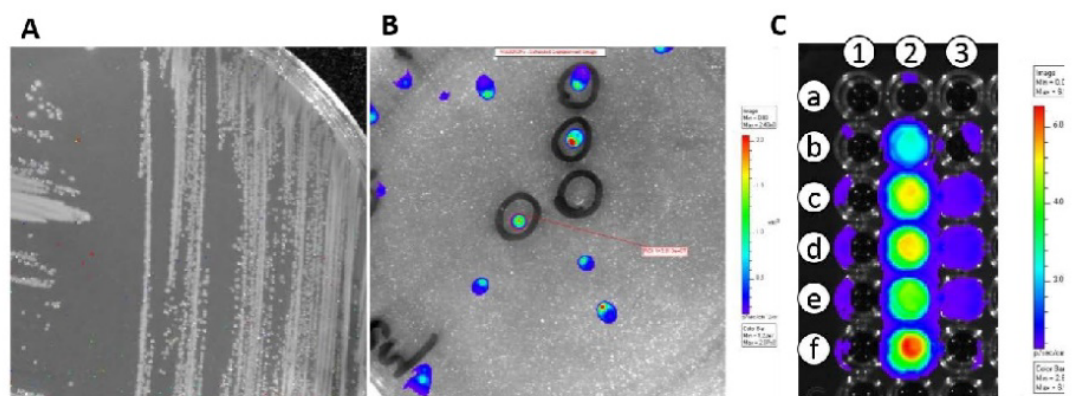
### 3. Results

#### 3.1 Transformation of *E. coli* and LAB strains with pMG36e::luxAB and pMG36e::luxABCDE

Transformation of *E. coli* competent cells with plasmid pMG36e::luxAB or pMG36e::luxABCDE led to bacterial growth in selective conditions. Some colonies showed bioluminescence both in broth (RLU>1500) and agar plates and, therefore, were selected for further studies (Figure1). Presence of the *lux* operon in the transformed cells was also confirmed by PCR amplification of *lux* operon-specific fragments.

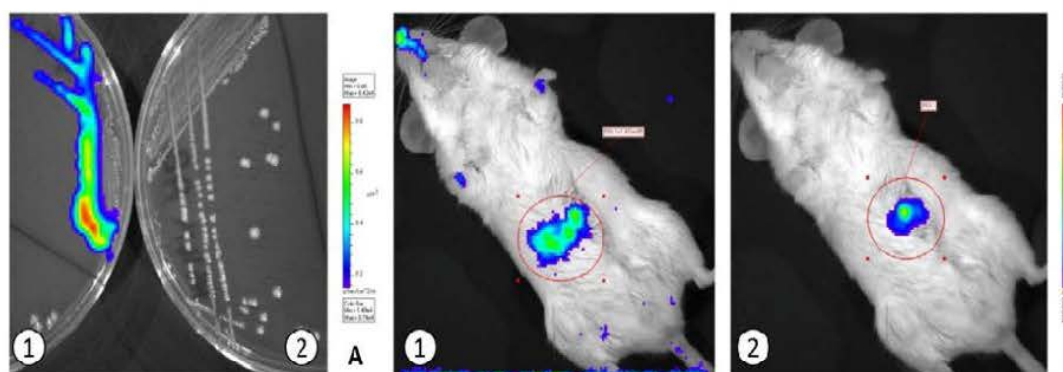
Similarly, successful transformation of *L. lactis* MG1614 with either pMG36e::luxAB or pMG36e::luxABCDE and that of *L. salivarius* PS2 with pMG36e::luxAB was confirmed by bioluminescence and PCR (Figure 2). However, transformation of *L. salivarius* PS2 with pMG36e::luxABCDE was not possible after several electroporation attempts. Addition of D-luciferin Firefly (Xenogen) to the growth medium (150 µg/ml) was required in order to generate and detect bioluminescence by *L. salivarius* PS2 containing only the *luxAB* genes.

The stability of *L. salivarius* PS2 transformed with pMG36e::luxAB was measured during ~100 generations under selective (Em-supplemented) and non-selective conditions. The growth of the transformed strain in selective medium was ~1 log<sub>10</sub> cycle higher in comparison to that observed in the non-selective one. Such difference remained constant along time, indicating that recombinant plasmid was stable in *L. salivarius* PS2.



**Figure 1.** Transformation of *E. coli* with the *lux* operon. (A) LB agar plate showing non-transformed *E. coli* cells (negative control); (B) LB agar plate showing *E. coli* cells transformed with pMG36e::luxABCDE. (C) Microtitre plate showing *E. coli* cells transformed with pMG36e::luxABCDE; column 1, non-inoculated LB medium (negative control); column 2, files b to f: serial dilutions of *E. coli* cells transformed with pMG36e::luxABCDE.



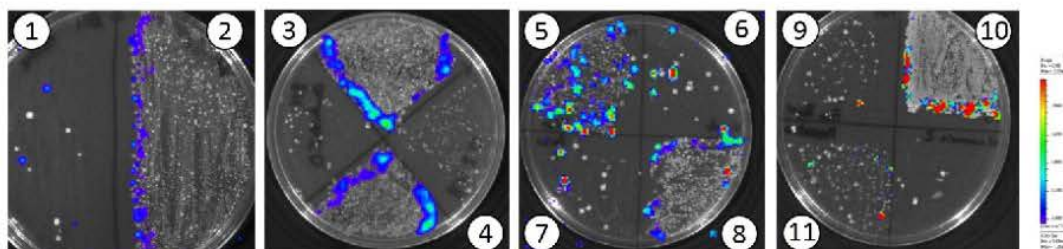


**Figure 2.** *In vitro* and *in vivo* detection of *L. lactis* MG1614 transformed with pMG36::luxABCDE. (A) GM17 agar plate with transformed (left) and non-transformed (right) *L. lactis* MG1614 cells. (B) Mouse immediately (left) and 20 min (right) after being fed with *L. lactis* pMG36::luxABCDE.

### 3.2 In vivo translocation model

A strong bioluminescence signal was detected in the stomach of mice during the first 20 minutes after oral administration of the transformed strains (Figure 2). The bacteria gradually entered (and became diluted) in the gut compartment and, as a consequence, bioluminescence was lost ~1 h after their administration.

In relation to recombinant *L. lactis* (pMG36::eluxABCDE), mice were sacrificed at the end of the assay and biological samples (milk, urine and faeces) and biopsies of different organs and tissues were collected, homogenized (when required), and seeded on plates of agar GM17 supplemented with Em (2.5 µg ml<sup>-1</sup>). After incubation, bioluminescent *L. lactis* colonies could be isolated from the samples of milk, urine and feces and from the biopsies of mammary gland, liver, kidney, intestine, stomach, Peyer patches, spleen, uterus and puppies' tissues (Figure 3).



**Figure 3.** Isolation of transformed *L. lactis*MG1614 cells on GM17 agar plates from different murine biological samples and organ biopsies: 1, milk; 2, feces; 3, small intestine; 4, large intestine; 5, kidney; 6, liver; 7, spleen; 8, stomach; 9, Peyer's patch; 10, urine; and 11, mammary gland.

With respect to recombinant *L. salivarius* (pMG36::eluxAB), the four mice that received the strain and one from the control group were sacrificed a day after delivery. Feces and biopsies from small intestine, cecum, mammary gland, spleen and mesenteric lymph nodes were collected, homogenized (when required), and seeded on MRS and, also, on MRS supplemented with Em (5 µg ml<sup>-1</sup>) agar plates. PCR analyses were also carried to detect presence of the *luxAB* genes in the biological samples. The counts obtained from the different samples analyzed in this study are shown in Table 2. Bacterial growth was observed in the fecal samples from all the animals. As expected, fecal bacterial counts (expressed as cfu/g) were 3-4 log<sub>10</sub> cycles higher in MRS (non-selective medium) than in Em-supplemented MRS (selective medium) plates. The *luxAB* fragment could be detected by PCR from feces of the four mice that received the recombinant strain but not from those collected from the control animal. In addition, the strain could be isolated and PCR-detected from

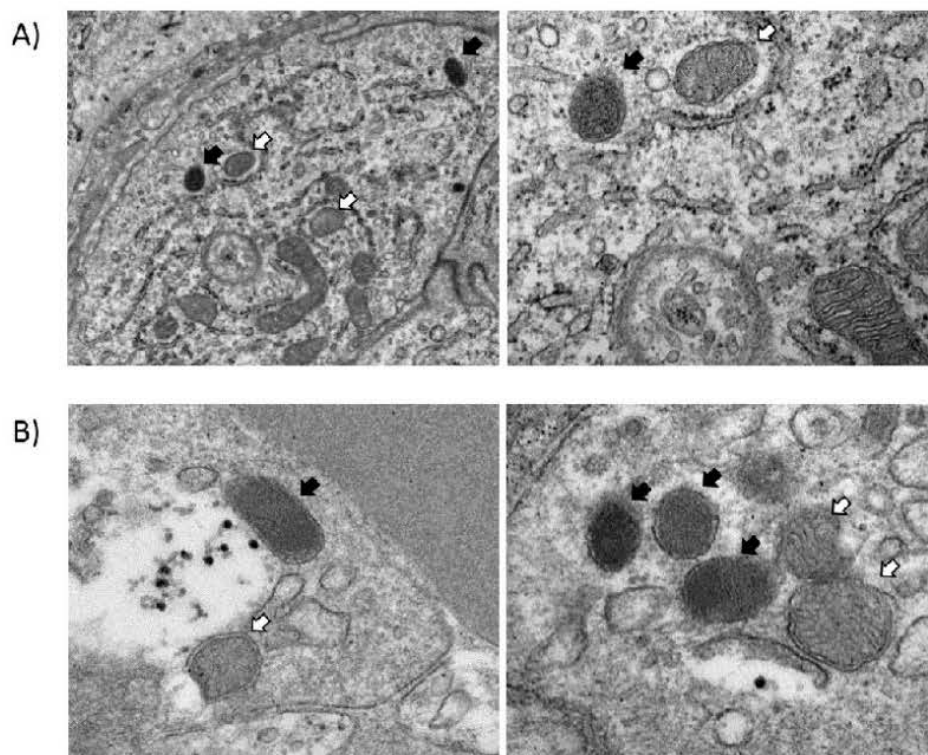
mammary biopsies of the pregnant mice but not from those collected from the non-pregnant mice). Bacterial counts in the mammary samples were notably lower than fecal counts obtained from the same media and from the same animal (Table 2).

The *luxAB* fragment could not be detected either in spleen or in mesenteric lymph node samples. However, bacteria were observed in mesenteric lymph nodes (Figure 4A) and spleen (Figure 4B) by TEM image analysis. Using such technique, bacterial cells appeared as a double membrane surrounding a dense content (chromatin) (Figure 4). Similar structures were detected in mammary gland biopsies.

**Table 2.** *L. salivarius* PS2 counts ( $\log_{10}$  cfu/g) in the biological samples collected from mice (1 and 2 non-pregnant mice; 3 and 4, pregnant mice; 5, control group mouse) that were fed with *L. salivarius* PS2 cells transformed with plasmid pMG36e:*luxAB*.

Sample	Mice	MRS	Growth medium
			MRS-Em <sup>a</sup>
Feces	1	na	5.92
	2	7.96	4.72
	3	7.54	4.26
	4	7.96	3.48
Small intestine	1	4.80	3.00
	2	4.64	nd
	3	4.96	nd
	4	na	na
Large intestine	1	6.65	5.54
	2	na	na
	3	6.48	2.70
	4	6.23	4.56
Spleen	1	nd	nd
	2	nd	nd
	3	nd	nd
	4	3.65	3.90
Mammary gland tissue	1	nd	nd
	2	nd	nd
	3	4.98	3.30
	4	4.98	3.00

<sup>a</sup>MRS supplemented with erythromycin; na, sample not available; nd, not detected.



**Figure 4.** TEM images. Bacteria (black arrows) and mitochondria (white arrows) present in samples from a mesenteric lymph node (A) and spleen (B).

#### 4. DISCUSSION

In this work, two LAB strains (*L. lactis* MG1614 and *L. salivarius* PS2) were genetically modified to harbor genes belonging to the *lux* operon. This strain-labeling method constitutes an excellent tool for *in vivo* whole-body detection of bacteria in animal models [24]. Its advantages include (a) a very sensitive and rapid detection of luciferase activity, (b) a luminescent response that is linearly dependent on the amount of luciferase, and (c) the possibility of using real-time non-invasive techniques when combined with low-light imaging CCD cameras [24,25].

The recombinant plasmid pMG36e:*luxABCDE* was successfully transformed into *L. lactis* MG1614 but, it could not be successfully electroporated into *L. salivarius* PS2. The large size of the plasmid (>10 kb) and the fact that *L. salivarius* PS2 is a wild strain may explain our inability to obtain transformants. Fortunately, *L. salivarius* PS2 cells were transformed with the smaller pMG36e:*luxAB* plasmid. In the absence of the *luxCDE* genes, strain-specific bioluminescence can still be detected provided that D-luciferin is added to the growth medium.

Both strains could be isolated (and the *lux* genes detected by PCR) from either milk or mammary gland biopsies after their oral administration to pregnant mice. While some may argue that their presence in milk might be the result of superficial fecal contamination in mice, such route can hardly explain their isolation and detection from mammary biopsies. In a previous work, oral administration of *L. salivarius* PS2 to pregnant women led to the presence of the strain in milk of some of the women after delivery [16]. It must be noted that, in contrast to mice, fecal contamination of human milk is highly improbable and, in fact, enterobacteria are usually absent in milk samples collected by manual expression from healthy women [26]. Our results reinforce the hypothesis that, at least, some members of the milk microbiota may arise from the digestive tract of the mother.

In the last years, some culture-dependent studies have revealed that milk from healthy women contain bacteria, including staphylococci, streptococci, corynebacteria, lactic acid bacteria, propionibacteria and bifidobacteria [1]. The application of culture-independent techniques, including microbiomic and metagenomic approaches, confirmed the presence of DNA from these and other bacterial genera [27–32]. Therefore, such biological fluids are continuous sources of live bacteria to the infant gastrointestinal tract and, in fact, different studies have shown that there is a mother-to-infant transfer of bacterial strains through breastfeeding [30,33–35].

Traditionally, any bacterial cell present in human milk was considered as the result of contamination arising from the infant's oral cavity or the mother's skin. Despite sharing of some phylotypes, the comparison between the bacterial communities detected in milk and those found on breast skin or in the infant's mouth reveals major differences between them [28,29,31,32]. Presence of oral-related bacteria in milk may precede the first feeding since colostrum collected within 24 h after birth has been found to contain typical oral bacteria like *Veillonella*, *Leptotrichia*, and *Prevotella* [29]. In addition, contamination from the breastfed baby's oral cavity does not explain why pre-colostrum secreted by some women before delivery (and, obviously, before any contact with the baby's mouth) already contains the microbiota that characterizes human milk [3].

In addition, the detection of live bacterial cells and/or DNA from anaerobic species that are generally related to the gut environment and that can not survive in aerobic sites has fuelled a scientific debate on the origin of milk-associated bacteria, and served to hypothesize that some of the human milk bacteria may originate in the maternal digestive tract (mouth, gastrointestinal tract) and reach the mammary gland through an endogenous route [3,36]. As an example, sharing of DNA of strict anaerobic genera, like *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* and members of the Clostridia class (*Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella* and *Veillonella*) in maternal faeces, human milk and neonatal faeces within the same mother–neonate pair has already been reported [4,30]. Furthermore, several butyrate-producing members of the Clostridia (*Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* and *Subdoligranulum*) were shared between maternal faeces and human milk [30]. A recent metagenome analysis of human milk has also revealed the presence of DNA belonging to such anaerobes [32].

A major drawback of culture-independent studies is the lack of information about the viability of the detected populations and the lack of possibility for strain level discrimination, which is necessary for demonstrating that the same bacterial strain was shared between mother and neonate. A second caveat of molecular methods is the low amount of DNA typically extracted from milk samples, making the relative proportion of contaminant DNA from sample manipulation and from DNA extraction reagents more important than when analyzing other biological samples, such as feces [32,37]. Thus, without confirming the presence of these populations by culture, isolation and strain level discrimination, it remains unclear whether human milk is a source of viable gut-associated obligate anaerobes, or if dead cells or parts thereof are transferred to the breast-fed neonate [30]. However, transfer of bifidobacteria, lactobacilli and/or other bacteria strains from maternal gastrointestinal tract to the neonatal gut [38–40], from maternal gastrointestinal tract to human milk [6,16,41,42], from milk to the neonatal gastrointestinal tract [34,43], and from maternal gastrointestinal tract to milk and infant gastrointestinal tract [30,33] have also been demonstrated using culture and strain level discrimination. Such studies reinforce the hypothesis that at least some bacteria, including obligate anaerobes, may be vertically transferred from mother to neonate via breastfeeding.

Consequently, it has been suggested that selected bacteria of the maternal digestive microbiota can access the mammary glands through oral- and entero-mammary pathways [3,36,44]. Previous studies have indicated that certain bacteria from the maternal digestive tract may spread to extra-digestive locations in healthy hosts [45–49]. Although this constitutes a controversial issue, some studies have offered a scientific basis for such physiological translocation (reviewed in [36]). The mechanism would involve dendritic (DC) and CD18<sup>+</sup> cells [50–52], which would be able to take up non-pathogenic bacteria from the gut lumen and, subsequently, carry them to other locations, including the lactating mammary gland [53]. In fact, there is an intense efflux of intestinal immune



cells to the mammary glands during late pregnancy and lactation [54] and that the existence of an entero-mammary circulation of IgA-producing cells is long known [55].

Oral inoculation of pregnant mice with a genetically-labelled LAB strain led to the isolation and PCR detection of the labelled strain in the amniotic fluid and milk of the inoculated animals [46]. In contrast, it could not be detected in the respective samples obtained from a non-inoculated control group. An increased bacterial translocation from the gut to mesenteric lymph nodes and mammary glands in pregnant and lactating mice was observed in another study [4]. The authors showed that bacteria could be detected histologically in the subepithelial dome and interfollicular regions of Peyer's patches, in the *lamina propria* of the small bowel, and associated with cells in the glandular tissue of the mammary gland. The Peyer's patches of pregnant and lactating mice were macroscopically larger than those of control animals and had a more prominent subepithelial dome and more dilated draining lymphatic vessels, containing mononuclear cells.

Similarly, oral administration of lactobacilli strains isolated from human milk led to their presence in the milk of more than 50% of the recruited women [5,6,16]. In a study cited above, acridine orange staining of human milk and blood cytopreparations allowed the identification of bacterial cells in association with maternal mononuclear cells [4]. Globally, these results strongly suggest the involvement of mononuclear cells in the transport of intestinal bacteria to the mammary glands in late pregnancy.

The term bacterial translocation was defined as the passage of viable bacteria from the gastrointestinal tract into the *lamina propria* and, then, to the mesenteric lymph nodes and other extraintestinal organs such as spleen, liver, kidneys, peritoneal cavity or bloodstream [56]. Traditionally, gut bacteria translocation has been associated with pathogenic conditions and, therefore, it has been mainly studied in patients in whom pathogenic bacteria had spread throughout the body causing sepsis, multiple organ failure and, sometimes, death [57-59]. However, it is known that a low rate bacterial translocation also occurs in healthy individuals without causing detrimental effects on the host [59-63]. Extraintestinal recovery of *Bacteroides*, lactobacilli, bifidobacteria and enterococci has been repeatedly reported in healthy mice [64,65]. Indeed, it has been suggested that bacterial translocation to extra-intestinal tissues is a beneficial physiological event in healthy hosts since it could be associated with immunomodulation, including the initial maturation of the neonatal immune system [4,66,67]. Some bacterial strains seems to specifically mediate its own translocation with no collateral translocation of other commensal bacteria from the host digestive tract [12,68].

Many transient anatomical and physiological changes occur during pregnancy and lactation to provide a suitable framework for the development of the foetus first and the neonate, later. These changes affect virtually all systems, including the cardiovascular, respiratory, genitourinary and digestive ones. Interestingly, such adaptations may favour an increased bacterial translocation during late pregnancy and early lactation. Adequate cardiovascular adaptations must secure good placental development and appropriate foetal growth. Therefore, changes in the cardiovascular system are characterized by a progressive and generalized vasodilatation state and an increase in several parameters or processes, including blood volume, stroke volume, cardiac output, heart rate, regional blood flow to various organs (uterus, kidneys, GI tract, skin, breasts...), angiogenesis and blood concentration of coagulation factors and leukocytes [44].

Hormonal action also induces relevant oral changes during pregnancy, affecting the pH and microbiota composition; the gums become hyperemic and edematous and tend to bleed, and the transfer of some bacterial species and inflammatory compounds to the bloodstream have been associated with the onset of premature birth [69]. The main effects of gestation on the gastrointestinal system are associated to the displacement of the abdominal organs by the progressive growth of the uterus and, also, to a decreased motility, presumably due to the effect of progesterone on smooth muscle contractility. This causes an increase in the gastric emptying time while a decreased gastric secretion results in a more basic gastric pH. In addition, the maternal mesenteric blood vessels are exposed to oestrogens and to an increasing foetal pressure, leading to transient vascular engorgements and blood stasis. Additionally, one of the most dramatic body's

adaptations to late pregnancy and lactation is a large increase in the size and complexity of the maternal intestine [70]. Globally, the digestive tract is characterized by weakened barriers against bacterial growth, increased permeability and reduced peristalsis, three factors that are closely associated to bacterial translocation [61].

Finally, several anatomical and physiological changes of the mammary system, including ducts, areola and nipples [71], during pregnancy facilitate the formation of a specific mammary microbiota [1]. Interestingly, there is a functional relationship between the intestinal tract and the mammary glands during late pregnancy and lactation[70].

At present, it is widely accepted that microbes are present in diverse organs and tissues previously thought to be sterile environments, including tumors [12]. Oral administration of a probiotic *Bifidobacterium breve* strain harboring a *lux*-expressing plasmid to mice bearing subcutaneous tumors led to its presence in tumors at levels similar to intravenous administration [12]. Although the presence of tumors was not necessary for translocation to systemic organs to occur, reporter gene expression was visible for more than 2 weeks in such locations and mice remained healthy throughout experiments. Similarly, another probiotic strain (*E. coli* Nissle 1917) robustly colonized tumor tissue in rodent models of liver metastasis after oral delivery but did not colonize healthy organs or fibrotic liver tissue [68]. No deleterious health effects were observed on the mice for more than 12 months after oral delivery. The authors suggested that oral delivery could lead to the preferential colonization of liver tumors by allowing probiotics to follow physiological blood flow patterns, wherein the venous outflow from the gut is directed to the liver via the hepatic portal vein.

This phenomenon has been attributed to, at least, three different factors: (a) suppressed immune surveillance within the tumor; (b) tumor vascularization, and (c) increased availability of nutrients in the necrotic tumor core [72-75]. It has been proposed that the entry, survival, and replication of bacteria in tumors depends on the vascularization and immune-privileged nature of solid tumors, which may provide a suitable microenvironment for a small spectrum of bacterial species [73]. The nutrient rich environment may also play an important role since tumors can support the growth of auxotrophic *S. typhimurium* strains [75-77]. Interestingly, the same factors are also present in the mammalian glands during late pregnancy and may explain the selective tropism or homing effect that the mammary gland seems to exert on some maternal bacterial species during such life stage: (a) there is a physiological immunodepression state in order to tolerate the fetus; (b) as stated above, there is a formidable angiogenesis process; and (c) pre-colostrum starts to fill the mammary duct during the last third of pregnancy providing a rich nutrient environment for bacteria.

Further studies are required to elucidate the mechanisms by which some bacterial strains may translocate physiologically in certain hosts or life stages. The existence of such bacterial oral- and entero-mammary pathways would provide new opportunities for manipulating an altered maternal-fetal microbiota, reducing the risk of preterm birth or infant diseases.

**Acknowledgments:** This research was supported by Nutricia Research (Utrecht, The Netherlands), and by grants AGL2016-75476-R, PCIN-2015-234, RED RICET RD12/0018/0004 and BIOMID (ISCIII), SAF2016-75988-R (MINECO), HOMIN-317057- FP7-PEOPLE-2012-ITN (EU)

**Author Contributions:** Juan M. Rodríguez, Manuel Fresno and Leonides Fernández conceived, designed the experiments, and prepared the manuscript; Javier de Andrés, Esther Jiménez and Isabel Chico performed the experiments, analyzed the data and revised the manuscript.

**Conflicts of Interest:** The study was sponsored by Nutricia Research (Utrecht, The Netherlands).

## References

1. Fernandez, L.; Langa, S.; Martin, V.; Maldonado, A.; Jimenez, E.; Martin, R.; Rodriguez, J.M. The Human Milk Microbiota: Origin and Potential Roles in Health and Disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*, 1-10.



2. Jeurink, P.V.; van Bergenhenegouwen, J.; Jimenez, E.; Knippels, L.M.; Fernandez, L.; Garssen, J.; Knol, J.; Rodriguez, J.M.; Martin, R. Human Milk: A Source of More Life than we Imagine. *Benef Microbes* **2013**, *4*, 17-30.
3. Martín, R.; Langa, S.; Reviriego, C.; Jiménez, E.; Marín, M.L.; Olivares, M.; Boza, J.; Jiménez, J.; Fernández, L.; Xaus, J. *et al.* The Commensal Microflora of Human Milk: New Perspectives for Food Bacteriotherapy and Probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 121-127.
4. Perez, P.F.; Dore, J.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Benyacoub, J.; Serrant, P.; Segura-Roggero, I.; Schiffrin, E.J.; Donnet-Hughes, A. Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons from Maternal Cells? *Pediatrics* **2007**, *119*, e724-32.
5. Jimenez, E.; Fernandez, L.; Maldonado, A.; Martin, R.; Olivares, M.; Xaus, J.; Rodriguez, J.M. Oral Administration of *Lactobacillus* Strains Isolated from Breast Milk as an Alternative for the Treatment of Infectious Mastitis during Lactation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 4650-4655.
6. Arroyo, R.; Martin, V.; Maldonado, A.; Jimenez, E.; Fernandez, L.; Rodriguez, J.M. Treatment of Infectious Mastitis during Lactation: Antibiotics Versus Oral Administration of Lactobacilli Isolated from Breast Milk. *Clin. Infect. Dis.* **2010**, *50*, 1551-1558.
7. Dunlap, P. Biochemistry and Genetics of Bacterial Bioluminescence. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2014**, *144*, 37-64.
8. Rocchetta, H.L.; Boylan, C.J.; Foley, J.W.; Iversen, P.W.; LeTourneau, D.L.; McMillian, C.L.; Contag, P.R.; Jenkins, D.E.; Parr, T.R., Jr. Validation of a Noninvasive, Real-Time Imaging Technology using Bioluminescent *Escherichia coli* in the Neutropenic Mouse Thigh Model of Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 129-137.
9. Wiles, S.; Clare, S.; Harker, J.; Huett, A.; Young, D.; Dougan, G.; Frankel, G. Organ Specificity, Colonization and Clearance Dynamics in Vivo Following Oral Challenges with the Murine Pathogen *Citrobacter Rodentium*. *Cell. Microbiol.* **2004**, *6*, 963-972.
10. Dunn, A.K.; Rader, B.A.; Stabb, E.V.; Mandel, M.J. Regulation of Bioluminescence in Photobacterium *Leiognathi* Strain KNH6. *J. Bacteriol.* **2015**, *197*, 3676-3685.
11. Diehl, G.E.; Longman, R.S.; Zhang, J.X.; Breart, B.; Galan, C.; Cuesta, A.; Schwab, S.R.; Littman, D.R. Microbiota Restricts Trafficking of Bacteria to Mesenteric Lymph Nodes by CX(3)CR1(Hi) Cells. *Nature* **2013**, *494*, 116-120.
12. Cronin, M.; Morrissey, D.; Rajendran, S.; El Mashad, S.M.; van Sinderen, D.; O'Sullivan, G.C.; Tangney, M. Orally Administered Bifidobacteria as Vehicles for Delivery of Agents to Systemic Tumors. *Mol. Ther.* **2010**, *18*, 1397-1407.
13. Gasson, M.J. Plasmid Complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and Other Lactic Streptococci After Protoplast-Induced Curing. *J. Bacteriol.* **1983**, *154*, 1-9.
14. Vazquez-Fresno, R.; Llorach, R.; Marinic, J.; Tulipani, S.; Garcia-Aloy, M.; Espinosa-Martos, I.; Jimenez, E.; Rodriguez, J.M.; Andres-Lacueva, C. Urinary Metabolomic Fingerprinting After Consumption of a Probiotic Strain in Women with Mastitis. *Pharmacol. Res.* **2014**, *87*, 160-165.
15. Espinosa-Martos, I.; Jimenez, E.; de Andres, J.; Rodriguez-Alcala, L.M.; Tavarez, S.; Manzano, S.; Fernandez, L.; Alonso, E.; Fontecha, J.; Rodriguez, J.M. Milk and Blood Biomarkers Associated to the Clinical Efficacy of a Probiotic for the Treatment of Infectious Mastitis. *Benef Microbes* **2016**, *7*, 305-318.
16. Fernandez, L.; Cardenas, N.; Arroyo, R.; Manzano, S.; Jimenez, E.; Martin, V.; Rodriguez, J.M. Prevention of Infectious Mastitis by Oral Administration of *Lactobacillus salivarius* PS2 during Late Pregnancy. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *62*, 568-573.
17. Francis, K.P.; Joh, D.; Bellinger-Kawahara, C.; Hawkinson, M.J.; Purchio, T.F.; Contag, P.R. Monitoring Bioluminescent *Staphylococcus aureus* Infections in Living Mice using a Novel luxABCDE Construct. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 3594-3600.
18. van de Guchte, M.; van der Vossen, J.M.; Kok, J.; Venema, G. Construction of a Lactococcal Expression Vector: Expression of Hen Egg White Lysozyme in *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 224-228.
19. Holo, H.; Nes, I.F. High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus Lactis* Subsp. *Cremoris* Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 3119-3123.

20. Mason, C.K.; Collins, M.A.; Thompson, K. Modified Electroporation Protocol for Lactobacilli Isolated from the Chicken Crop Facilitates Transformation and the use of a Genetic Tool. *J. Microbiol. Methods* **2005**, *60*, 353-363.
21. Alvarez-Martin, P.; O'Connell-Motherway, M.; van Sinderen, D.; Mayo, B. Functional Analysis of the pBC1 Replicon from *Bifidobacterium catenulatum* L48. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 1395-1402.
22. Faul, F.; Erdfelder, E.; Lang, A.G.; Buchner, A. G\*Power 3: A Flexible Statistical Power Analysis Program for the Social, Behavioral, and Biomedical Sciences. *Behav. Res. Methods* **2007**, *39*, 175-191.
23. Jimenez, E.; Marin, M.L.; Martin, R.; Odriozola, J.M.; Olivares, M.; Xaus, J.; Fernandez, L.; Rodriguez, J.M. Is Meconium from Healthy Newborns Actually Sterile? *Res. Microbiol.* **2008**, *159*, 187-193.
24. Greer, L.F., 3rd; Szalay, A.A. Imaging of Light Emission from the Expression of Luciferases in Living Cells and Organisms: A Review. *Luminescence* **2002**, *17*, 43-74.
25. Gahan, C.G. The Bacterial Lux Reporter System: Applications in Bacterial Localisation Studies. *Curr. Gene Ther.* **2012**, *12*, 12-19.
26. Mediano, P.; Fernandez, L.; Jimenez, E.; Arroyo, R.; Espinosa-Martos, I.; Rodriguez, J.M.; Marin, M. Microbial Diversity in Milk of Women with Mastitis: Potential Role of Coagulase-Negative Staphylococci, Viridans Group Streptococci, and Corynebacteria. *J. Hum. Lact.* **2017**, *33*, 309-318.
27. Martin, R.; Heilig, H.G.; Zoetendal, E.G.; Jimenez, E.; Fernandez, L.; Smidt, H.; Rodriguez, J.M. Cultivation-Independent Assessment of the Bacterial Diversity of Breast Milk among Healthy Women. *Res. Microbiol.* **2007**, *158*, 31-37.
28. Hunt, K.M.; Foster, J.A.; Forney, L.J.; Schutte, U.M.; Beck, D.L.; Abdo, Z.; Fox, L.K.; Williams, J.E.; McGuire, M.K.; McGuire, M.A. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLoS One* **2011**, *6*, e21313.
29. Cabrera-Rubio, R.; Collado, M.C.; Laitinen, K.; Salminen, S.; Isolauri, E.; Mira, A. The Human Milk Microbiome Changes Over Lactation and is Shaped by Maternal Weight and Mode of Delivery. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *96*, 544-551.
30. Jost, T.; Lacroix, C.; Braegger, C.P.; Rochat, F.; Chassard, C. Vertical Mother-Neonate Transfer of Maternal Gut Bacteria Via Breastfeeding. *Environ. Microbiol.* **2014**, *16*, 2891-2904.
31. Jost, T.; Lacroix, C.; Braegger, C.; Chassard, C. Assessment of Bacterial Diversity in Breast Milk using Culture-Dependent and Culture-Independent Approaches. *Br. J. Nutr.* **2013**, *110*, 1253-1262.
32. Jimenez, E.; de Andres, J.; Manrique, M.; Pareja-Tobes, P.; Tobes, R.; Martinez-Blanch, J.F.; Codoner, F.M.; Ramon, D.; Fernandez, L.; Rodriguez, J.M. Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *J. Hum. Lact.* **2015**, *31*, 406-415.
33. Albesharat, R.; Ehrmann, M.A.; Korakli, M.; Yazaji, S.; Vogel, R.F. Phenotypic and Genotypic Analyses of Lactic Acid Bacteria in Local Fermented Food, Breast Milk and Faeces of Mothers and their Babies. *Syst. Appl. Microbiol.* **2011**, *34*, 148-155.
34. Martin, V.; Maldonado-Barragan, A.; Moles, L.; Rodriguez-Banos, M.; Campo, R.D.; Fernandez, L.; Rodriguez, J.M.; Jimenez, E. Sharing of Bacterial Strains between Breast Milk and Infant Feces. *J. Hum. Lact.* **2012**, *28*, 36-44.
35. Milani, C.; Mancabelli, L.; Lugli, G.A.; Duranti, S.; Turrone, F.; Ferrario, C.; Mangifesta, M.; Viappiani, A.; Ferretti, P.; Gorfer, V. *et al.* Exploring Vertical Transmission of Bifidobacteria from Mother to Child. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 7078-7087.
36. Rodriguez, J.M. The Origin of Human Milk Bacteria: Is there a Bacterial Entero-Mammary Pathway during Late Pregnancy and Lactation? *Adv. Nutr.* **2014**, *5*, 779-784.
37. Salter, S.J.; Cox, M.J.; Turek, E.M.; Calus, S.T.; Cookson, W.O.; Moffatt, M.F.; Turner, P.; Parkhill, J.; Loman, N.J.; Walker, A.W. Reagent and Laboratory Contamination can Critically Impact Sequence-Based Microbiome Analyses. *BMC Biol.* **2014**, *12*, 87-014-0087-z.
38. Makino, H.; Kushiro, A.; Ishikawa, E.; Muylaert, D.; Kubota, H.; Sakai, T.; Oishi, K.; Martin, R.; Ben Amor, K.; Oozeer, R. *et al.* Transmission of Intestinal Bifidobacterium Longum Subsp. Longum Strains from Mother to Infant, Determined by Multilocus Sequencing Typing and Amplified Fragment Length Polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 6788-6793.
39. Takahashi, H.; Mikami, K.; Nishino, R.; Matsuoka, T.; Kimura, M.; Koga, Y. Comparative Analysis of the Properties of Bifidobacterial Isolates from Fecal Samples of Mother-Infant Pairs. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2010**, *51*, 653-660.

40. Kulagina, E.V.; Shkoporov, A.N.; Kafarskaia, L.I.; Khokhlova, E.V.; Volodin, N.N.; Donskikh, E.E.; Korshunova, O.V.; Efimov, B.A. Molecular Genetic Study of Species and Strain Variability in Bifidobacteria Population in Intestinal Microflora of Breastfed Infants and their Mothers. *Bull. Exp. Biol. Med.* **2010**, *61*, 61–64.
41. Abrahamsson, T.R.; Sinkiewicz, G.; Jakobsson, T.; Fredrikson, M.; Bjorksten, B. Probiotic Lactobacilli in Breast Milk and Infant Stool in Relation to Oral Intake during the First Year of Life. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2009**, *49*, 349–354.
42. Martin, R.; Jimenez, E.; Olivares, M.; Marin, M.L.; Fernandez, L.; Xaus, J.; Rodriguez, J.M. Lactobacillus Salivarius CECT 5713, a Potential Probiotic Strain Isolated from Infant Feces and Breast Milk of a Mother-Child Pair. *Int. J. Food Microbiol.* **2006**, *112*, 35–43.
43. Martin, R.; Langa, S.; Reviriego, C.; Jimenez, E.; Marin, M.L.; Xaus, J.; Fernandez, L.; Rodriguez, J.M. Human Milk is a Source of Lactic Acid Bacteria for the Infant Gut. *J. Pediatr.* **2003**, *143*, 754–758.
44. Mira, A.; Rodriguez, J.M. The origin of human milk bacteria. In *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*; McGuire, M., McGuire, M. and Bode, L., Eds.; Academic Press: London, 2017; pp. 349–364.
45. Begier, E.M.; Barrett, N.L.; Mshar, P.A.; Johnson, D.G.; Hadler, J.L.; Connecticut Bioterrorism Field Epidemiology Response Team. Gram-Positive Rod Surveillance for Early Anthrax Detection. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1483–1486.
46. Jimenez, E.; Fernandez, L.; Marin, M.L.; Martin, R.; Odriozola, J.M.; Nueno-Palop, C.; Narbad, A.; Olivares, M.; Xaus, J.; Rodriguez, J.M. Isolation of Commensal Bacteria from Umbilical Cord Blood of Healthy Neonates Born by Cesarean Section. *Curr. Microbiol.* **2005**, *51*, 270–274.
47. Vankerckhoven, V.; Van Autgaerden, T.; Huys, G.; Vancanneyt, M.; Swings, J.; Goossens, H. Establishment of the PROSAFE Collection of Probiotic and Human Lactic Acid Bacteria. *Microb. Ecol. Health. Dis.* **2004**, *26*, 6.
48. Ouwehand, A.C.; Isolauri, E.; He, F.; Hashimoto, H.; Benno, Y.; Salminen, S. Differences in Bifidobacterium Flora Composition in Allergic and Healthy Infants. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2001**, *108*, 144–145.
49. Dasanayake, A.P.; Li, Y.; Wiener, H.; Ruby, J.D.; Lee, M.J. Salivary Actinomyces Naeslundii Genospecies 2 and Lactobacillus Casei Levels Predict Pregnancy Outcomes. *J. Periodontol.* **2005**, *76*, 171–177.
50. Vazquez-Torres, A.; Jones-Carson, J.; Baumler, A.J.; Falkow, S.; Valdivia, R.; Brown, W.; Le, M.; Berggren, R.; Parks, W.T.; Fang, F.C. Extraintestinal Dissemination of Salmonella by CD18-Expressing Phagocytes. *Nature* **1999**, *401*, 804–808.
51. Rescigno, M.; Urbano, M.; Valzasina, B.; Francolini, M.; Rotta, G.; Bonasio, R.; Granucci, F.; Kraehenbuhl, J.P.; Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic Cells Express Tight Junction Proteins and Penetrate Gut Epithelial Monolayers to Sample Bacteria. *Nat. Immunol.* **2001**, *2*, 361–367.
52. Macpherson, A.J.; Uhr, T. Induction of Protective IgA by Intestinal Dendritic Cells Carrying Commensal Bacteria. *Science* **2004**, *303*, 1662–1665.
53. Roitt, I.M.; Delves, P.J. *Essential Immunology*, 10th ed.; Oxford: Blackwell Science, 2001.
54. Bertotto, A.; Gerli, R.; Castellucci, G.; Scalise, F.; Vaccaro, R. Human Milk Lymphocytes Bearing the Gamma/Delta T-Cell Receptor are mostly Delta TCS1-Positive Cells. *Immunology* **1991**, *74*, 360–361.
55. Newburg, D.S. Innate Immunity and Human Milk. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1308–1312.
56. Berg, R.D.; Garlington, A.W. Translocation of Certain Indigenous Bacteria from the Gastrointestinal Tract to the Mesenteric Lymph Nodes and Other Organs in a Gnotobiotic Mouse Model. *Infect. Immun.* **1979**, *23*, 403–411.
57. Berg, R.D. Bacterial Translocation from the Gastrointestinal Tract. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *473*, 11–30.
58. Balzan, S.; de Almeida Quadros, C.; de Cleva, R.; Zilberstein, B.; Cecconello, I. Bacterial Translocation: Overview of Mechanisms and Clinical Impact. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2007**, *22*, 464–471.
59. Lichtman, S.M. Bacterial [Correction of Baterial] Translocation in Humans. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2001**, *33*, 1–10.
60. Sedman, P.C.; Macfie, J.; Sagar, P.; Mitchell, C.J.; May, J.; Mancey-Jones, B.; Johnstone, D. The Prevalence of Gut Translocation in Humans. *Gastroenterology* **1994**, *107*, 643–649.
61. Berg, R.D. Bacterial Translocation from the Gastrointestinal Tract. *Trends Microbiol.* **1995**, *3*, 149–154.
62. Moore, F.A.; Moore, E.E.; Poggetti, R.S.; Read, R.A. Postinjury Shock and Early Bacteremia. A Lethal Combination. *Arch. Surg.* **1992**, *127*, 893–7; discussion 897–8.

63. Rodriguez, A.V.; Baigori, M.D.; Alvarez, S.; Castro, G.R.; Oliver, G. Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Activity in *Lactobacillus Rhamnosus* with Capacity to Translocate. *FEMS Microbiol. Lett.* **2001**, *204*, 33-38.
64. Liong, M.T. Safety of Probiotics: Translocation and Infection. *Nutr. Rev.* **2008**, *66*, 192-202.
65. Yamazaki, S.; Machii, K.; Tsuyuki, S.; Momose, H.; Kawashima, T.; Ueda, K. Immunological Responses to Monoassociated *Bifidobacterium longum* and their Relation to Prevention of Bacterial Invasion. *Immunology* **1985**, *56*, 43-50.
66. Bengtmark, S.; Jeppsson, B. Gastrointestinal Surface Protection and Mucosa Reconditioning. *J. Parenter. Enteral Nutr.* **1995**, *19*, 410-415.
67. MacFie, J. Current Status of Bacterial Translocation as a Cause of Surgical Sepsis. *Br. Med. Bull.* **2004**, *71*, 1-11.
68. Danino, T.; Prindle, A.; Kwong, G.A.; Skalak, M.; Li, H.; Allen, K.; Hasty, J.; Bhatia, S.N. Programmable Probiotics for Detection of Cancer in Urine. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 289ra84.
69. Straka, M. Pregnancy and Periodontal Tissues. *Neuro Endocrinol. Lett.* **2011**, *32*, 34-38.
70. Hammond, K.A. Adaptation of the Maternal Intestine during Lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **1997**, *2*, 243-252.
71. Beischer, N.A.; Mackay, E.V.; Colditz, P.B. *Obstetrics and the Newborn*; WB Saunders Co.: Philadelphia (PA), 1997.
72. Li, X.; Fu, G.F.; Fan, Y.R.; Liu, W.H.; Liu, X.J.; Wang, J.J.; Xu, G.X. *Bifidobacterium Adolescentis* as a Delivery System of Endostatin for Cancer Gene Therapy: Selective Inhibitor of Angiogenesis and Hypoxic Tumor Growth. *Cancer Gene Ther.* **2003**, *10*, 105-111.
73. Yu, Y.A.; Shabahang, S.; Timiryasova, T.M.; Zhang, Q.; Beltz, R.; Gentschev, I.; Goebel, W.; Szalay, A.A. Visualization of Tumors and Metastases in Live Animals with Bacteria and Vaccinia Virus Encoding Light-Emitting Proteins. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 313-320.
74. Morrissey, D.; O'Sullivan, G.C.; Tangney, M. Tumour Targeting with Systemically Administered Bacteria. *Curr. Gene Ther.* **2010**, *10*, 3-14.
75. Zhao, M.; Yang, M.; Li, X.M.; Jiang, P.; Baranov, E.; Li, S.; Xu, M.; Penman, S.; Hoffman, R.M. Tumor-Targeting Bacterial Therapy with Amino Acid Auxotrophs of GFP-Expressing *Salmonella Typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 755-760.
76. Zhao, M.; Yang, M.; Ma, H.; Li, X.; Tan, X.; Li, S.; Yang, Z.; Hoffman, R.M. Targeted Therapy with a *Salmonella Typhimurium* Leucine-Arginine Auxotroph Cures Orthotopic Human Breast Tumors in Nude Mice. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 7647-7652.
77. Nagakura, C.; Hayashi, K.; Zhao, M.; Yamauchi, K.; Yamamoto, N.; Tsuchiya, H.; Tomita, K.; Bouvet, M.; Hoffman, R.M. Efficacy of a Genetically-Modified *Salmonella Typhimurium* in an Orthotopic Human Pancreatic Cancer in Nude Mice. *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 1873-1878.



© 2017 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



IV.5. Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study

Moles L, Escribano E, de Andrés J, Montes MT, Rodríguez JM, Jiménez E, Sáenz de Pipaón M, Espinosa-Martos I.

J Immunol Res. 2015;2015:538171. doi: 10.1155/2015/538171. Epub 2015 Feb 22.





## Research Article

# Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, Two Strains Isolated from Human Milk, to Very Low and Extremely Low Birth Weight Preterm Infants: A Pilot Study

Laura Moles,<sup>1</sup> Esperanza Escribano,<sup>2</sup> Javier de Andrés,<sup>1,3</sup>  
María Teresa Montes,<sup>2</sup> Juan M. Rodríguez,<sup>1,3</sup> Esther Jiménez,<sup>3</sup>  
Miguel Sáenz de Pipaón,<sup>2</sup> and Irene Espinosa-Martos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Servicio de Neonatología, Hospital Universitario La Paz, 28046 Madrid, Spain

<sup>3</sup>Probisearch, Tres Cantos, 28760 Madrid, Spain

Correspondence should be addressed to Irene Espinosa-Martos; [irene.espinosa@probisearch.com](mailto:irene.espinosa@probisearch.com)

Received 18 July 2014; Revised 8 September 2014; Accepted 16 September 2014

Academic Editor: Miguel Gueimonde

Copyright © 2015 Laura Moles et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The preterm infant gut has been described as immature and colonized by an aberrant microbiota. Therefore, the use of probiotics is an attractive practice in hospitals to try to reduce morbidity and mortality in this population. The objective of this pilot study was to elucidate if administration of two probiotic strains isolated from human milk to preterm infants led to their presence in feces. In addition, the evolution of a wide spectrum of immunological compounds, including the inflammatory biomarker calprotectin, in both blood and fecal samples was also assessed. For this purpose, five preterm infants received two daily doses ( $\sim 10^9$  CFU) of a 1:1 mixture of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934. Bacterial growth was detected by culture-dependent techniques in all the fecal samples. The phylum *Firmicutes* dominated in nearly all fecal samples while *L. salivarius* PS12934 was detected in all the infants at numerous sample collection points and *B. breve* PS12929 appeared in five fecal samples. Finally, a noticeable decrease in the fecal calprotectin levels was observed along time.

## 1. Introduction

The gut microbiota of preterm infants is usually described as aberrant when compared to that of healthy term infants. Very often, the former is characterized by a notably lower bacterial diversity, a lower presence of bifidobacteria, and a higher concentration of potentially pathogenic bacteria [1–7]. This may have short-, medium-, and long-term health consequences since early colonizing organisms interact with the intestinal mucosa to shape the developing immune system [8, 9].

In fact, interactions with different components of the microbiota are crucial to the establishment and development

of T-cell subsets, including NK, Treg, and Th17 cells, in the appropriate proportions to achieve homeostasis [10].

Many preterm infants lack an important part of transplacental transfer of maternal antibodies since this process occurs mainly in the last third of pregnancy; in addition, they have an impaired pattern-recognition receptor function and a reduced leukocyte endothelial adhesion and extracellular bacterial elimination [11]. Together, these alterations in the microbial colonization pattern and in the maturation of immune system, together with their stay in a hospital environment and other factors, predispose preterm infants to infections and/or to diseases such as necrotizing enterocolitis (NEC) [12–15].

The administration of probiotics to preterm neonates often leads to a decrease in the morbidity and mortality rates, in those of NEC and, in some cases, even in those of sepsis [16–22]. Additional benefits associated with probiotic supplementation in preterm neonates include earlier achievement of full enteral feeding [22], a lower colonization by *Enterobacteriaceae* [23], and a better neurological and immunological evolution [22, 24]. For these reasons, the number of institutions including probiotic supplementation in routine preterm care is increasing rapidly although the safety of probiotics in very low and extremely low birth weight infants is still a matter of debate [25], the mechanisms backing such effects are not well known yet [10], and global conclusions are difficult to establish because different studies usually make use of different probiotic strains, dosages, and/or treatment period.

Human milk is acknowledged as the best feeding option to preterm infants [26, 27] because its use decreases the incidence of many negative outcomes of prematurity, such as late onset sepsis or NEC [28–30]. In addition, human milk seems to be an important source of potentially beneficial bacteria to the infant gut and some strains may find future applications as probiotics for preterm infants [31–36]. In this context, the objective of this exploratory study was to assess early gut colonization in a short cohort of preterm neonates receiving a combination of two probiotic strains isolated from human milk. Furthermore, a wide variety of blood and fecal immunological parameters were assessed in order to elucidate their utility in future studies involving a larger cohort.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Study Design and Sampling.** Five preterm infants were enrolled in this study within 2 days after their birth. All of them met the following inclusion criteria: birth weight < 1,300 g, gestational age at birth < 29 weeks, and absence of any malformation or metabolic disease at birth. The most relevant demographic and clinical variables from mother-infant pairs were compiled by the Medical Staff of the Service of Neonatology of the Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain). The Ethical Committee on Clinical Research of the Hospital Universitario La Paz of Madrid approved all study protocols (code number: 3551). Samples and clinical information were obtained after written informed consent by the infants' parents. This trial is registered with ClinicalTrials.gov identifier NCT02192996.

After spontaneous meconium expulsion (between the second and the fourth days of life), a mixture of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, containing  $\sim 1 \times 10^9$  colony-forming units (CFU) of each strain, was suspended in a sterile saline solution and administered twice a day to the infants through an enteral feeding system. Meconium samples were collected prior to probiotic administration and, later, fecal ( $n = 14$ ) and blood ( $n = 10$ ) samples were collected weekly for up to 28 days. Fecal samples were aliquoted and stored at  $-80^\circ\text{C}$  or  $-20^\circ\text{C}$  until microbiological or immunological analysis, respectively.

Blood samples were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes; subsequently, the plasma was obtained within 4 h after extraction and stored at  $-20^\circ\text{C}$  until analysis.

**2.2. Microbiological Analysis.** Adequate dilutions of five meconium and fourteen stool samples were spread onto Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA; Oxoid) for *Enterococcus* species isolation; de Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with L-cysteine (0.5 g/L) (Sigma, St. Louis, USA) (MRScys) for isolation of lactic acid bacteria; MacConkey (MCK; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for isolation of *Enterobacteriaceae*; Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (SDC, BioMérieux) for isolation of yeasts; TOS-Propionate (TOS; Merck, NJ, USA) for isolation of bifidobacteria; and Columbia Nalidixic Acid Agar (CNA, BioMérieux) as a general medium for isolation of other bacterial groups. Plates were aerobically incubated at  $37^\circ\text{C}$  for up to 48 h, with the exception of MRScys and TOS plates that were anaerobically incubated (85% nitrogen, 10% hydrogen, and 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (Mini-MACS Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK) at  $37^\circ\text{C}$  for 48 h. Bacterial counts were recorded as the CFU/g of meconium or feces and transformed to  $\log_{10}$  values before statistical analysis.

At least one representative of each different colony type obtained from each sample was isolated. Approximately 140 isolates were analyzed by optical microscopy and identified by MALDI-TOF mass spectrometry in a Vitek-MS instrument (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) in the facilities of Probisearch S. L. (Tres Cantos, Spain).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) genotyping of all the isolates identified as *L. salivarius* or *B. breve* was carried following a protocol previously described [37]. The profiles were compared to those of *L. salivarius* PS12934 and *B. breve* PS12929, respectively.

**2.3. Immunological Analysis.** The concentration of 18 cytokines, chemokines, and growth factors, including interleukin (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 (p70), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-2, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-8, growth related oncogene- $\alpha$  (GRO- $\alpha$ ), macrophage-monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  (MIP-1 $\beta$ ), IL-5, IL-7, granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), was determined in 5 meconium, 14 feces, and 10 plasma samples by using a Bio-Plex 200 system instrument (Bio-Rad, Hercules, CA) and the Bio-Plex Pro Human Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assays (Bio-Rad). Parallel, the concentration of immunoglobulin (Ig) IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgM, and IgA was determined using the Bio-Plex Pro Human Isotyping Assay Kit (Bio-Rad).

Before analysis, 0.1 g of meconium and fecal samples was diluted in 0.9 mL of peptone water, homogenized, and centrifuged for 15 min at  $14,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$ ; then, supernatants ( $\geq 200 \mu\text{L}$ ) were collected. Plasma samples were defrosted and properly diluted immediately before the immunological assay. Analyses were carried out in duplicate following the



manufacturer's protocol and standard curves were performed for each analyte. Lower limit of quantification (LLOQ) was different for each one of the parameters, ranging from 0.02 to 11.74 ng/L for cytokines and from 0.01 to 2 ng/L for immunoglobulins.

Additionally, calprotectin levels (LLOQ: 8 ng/L) were determined in 5 meconium, 14 feces, and 8 plasma samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Calpro, Lysaker, Norway) according to the manufacturer's instructions. The standard curve of calprotectin was obtained from triplicates of each assayed concentration and fit to a 4-parameter curve model.

**2.4. Statistical Analysis.** The statistical analysis was performed using R 2.15.3 (R-project, <http://www.r-project.org>). When data were not normally distributed, medians and interquartile ranges (Q1 and Q3) were calculated for all sampling times, and means and 95% confidence interval (95% CI) were used for normally distributed data. The richness and diversity of meconium and fecal microbiota were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. The Kruskal-Wallis test for nonnormal data or one-way ANOVA test, when data were normally distributed, was used to evaluate the differences between sampling times, in all measured variables, in plasma samples and for the comparison of immunological variables between plasma and fecal samples. The nonparametric Friedman test or one-way ANOVA test, when data were normally distributed, was used in fecal samples to evaluate the differences between sampling times in all measured variables. In all cases, *P* values of <0.05 were considered to be significant. Redundancy analysis (RDA) was used for exploration of whole data sets and evaluation of the possible relationship between gut colonization and immunological parameters with the clinical status of the participants. Finally, heatmaps of plasma and fecal samples were plotted. To do this, calculation of Kendall's correlation coefficients was performed and Ward agglomeration methods were used to obtain the clustering of the variables and cases matrix.

### 3. Results

**3.1. Demographic and Clinical Characteristics of the Participants.** The clinical and demographic data of the mothers and infants who participate in this study are summarized in Table 1. Although five preterm infants were included in this study, there were 2 sets of twins (infants 1 and 2; infants 3 and 4) and, therefore, data were collected from three mothers (Table 1).

All the infants were female and were born by Cesarean section with a mean gestational age of 28 weeks and 2 days. The mean birth weight was 1,020.4 g and the mean height and head circumference were 34.5 cm and 25.0 cm, respectively. These parameters showed *Z*-scores < 0. Infants stayed in the NICU a mean time of 30.6 days with a mean age at discharge of 65.4 days, which represented a mean corrected gestational age of 37 weeks and 5 days (Table 1).

Additional information of clinical features is provided as supplemental information (Supplemental Information 1; see Table S1 of the Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2015/538171>).

**3.2. Microbiological Analysis.** Bacterial growth was detected in one meconium sample and in all the fecal samples. Differences in the bacterial counts of fecal samples were evaluated by nonparametric Friedman test on days 7, 14, 21, and 28 (data not shown).

Globally, the phylum *Firmicutes* predominated in all the fecal samples except in those belonging to infant 5 where *Proteobacteria* was present in a similar proportion (Figure 1(a)). On the other hand, *Proteobacteria* dominated at the 14th day of intervention in fecal samples of the siblings 3 and 4. The phylum *Actinobacteria*, mainly represented by the genus *Bifidobacterium*, was isolated from day 7 although not in all the fecal samples (Figure 1(a)).

Among the *Firmicutes*, the genera *Enterococcus* and *Lactobacillus* were isolated from all the fecal samples except in that of infant 2 at day 21 where *Lactobacillus* could not be detected. The bacterial counts of *Enterococcus* decreased significantly from day 7 to day 21 of treatment (*P* = 0.043) from 10.00 to 8.30 log CFU/g. In contrast, *Lactobacillus* counts increased from 6.60 log CFU/g after 7 days of probiotic treatment to 8.32 log CFU/g at the end of the intervention; in this case, the differences were not statistically significant due to both the individual variability and the small cohort. The genus *Staphylococcus* was mainly isolated in the first weeks of the study from meconium and 7-day fecal samples (Figure 1(b)) with median counts of 4.30 and 9.44 log CFU/g, respectively.

In relation to *Proteobacteria*, the genus *Enterobacter* was isolated from all the fecal samples except from two from infant 2 (days 7 and 21) and from one of infant 3 at day 28 (Figure 1(b)). Similarly, the genus *Klebsiella* was isolated from all fecal samples except from two collected at day 7 (siblings 3 and 4) and one at day 21 (infant 2). Bacterial counts of these two genera were significantly different at every sampling day (*P* = 0.007 and 0.046 for *Enterobacter* and *Klebsiella*, resp.) and a decrease was observed in *Klebsiella* median counts (from 10.19 log CFU/g at day 7 to 8.48 log CFU/g at day 28).

Finally, the *Bifidobacterium* median counts oscillated between 7.98 and 9.98 log CFU/g in the 6 fecal samples where this genus was detected (Figure 1(b)).

The SDI of the fecal samples fluctuated during the study probably due to the different antibiotic treatments that the infants received (Figure 1(c)).

In order to detect the presence of *L. salivarius* PS12934 and *B. breve* PS12929 in fecal samples, all the fecal isolates belonging to such species were PFGE genotyped. This technique revealed that *L. salivarius* PS12934 was present in all the infants at numerous sampling points while *B. breve* PS12929 could be detected after day 14.

The heatmap obtained from the fecal samples at different sampling times of all the infants is shown in Figure S1. The dendrogram resulted after Kendall correlation coefficient calculation highlights the similar species profile of fecal

TABLE 1: Epidemiological and clinical relevant data from the mother-infant pairs of this study.

Mothers	1	2	3		
Age (years)	30	18	28		
Fever	No	Yes	No		
Leukocytosis (>15,000 leukocytes/ $\mu$ L)	No	Yes	Yes		
C-reactive protein (mg/L)	26	7.6	40		
Antenatal antibiotics treatment	Yes	Yes	Yes		
Antenatal corticosteroids treatment	Complete	Uncomplete	Complete		
Chorioamnionitis	No	Yes	Yes		
Type of delivery	C-section	C-section	C-section		
Multiple delivery	Yes	Yes	No		
Infants	1	2	3	4	5
Rupture of fetal membranes (h)	672	0	0	0	432
Twin position	1	2	2	1	1
Sex	F	F	F	F	F
Gestational age (wk)	28 + 5	28 + 5	28 + 6	28 + 6	27 + 2
Birth weight (g) (Z-score)	1070 (−0.71)	980 (1.01)	1082 (−0.66)	1200 (−0.26)	770 (−1.02)
Birth height (cm) (Z-score)	36 (−1.3)	36 (−1.3)	36 (−1.3)	36 (−1.3)	32 (−1.8)
Birth head circumference (cm) (Z-score)	26 (−0.8)	26 (−0.8)	25.5 (−1.1)	26 (−0.8)	24 (−0.8)
Apgar score at 1 min	8	9	8	5	7
Apgar score at 5 min	9	9	9	7	8
Revival	Ventilation	No	Ventilation	Ventilation	Ventilation
PDA	Yes	No	Yes	Yes	No
Meconium spontaneous expulsion	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Meconium expulsion (h)	24	9	48	36	14
Probiotic starting age (d)	2	2	2	2	4
Probiotic treatment length (d)	18	18	31	19	25
NICU stay (d)	18	8	14	64	49
Age at discharge (d)	51	51	60	64	101
Corrected gestational age at discharge (wk)	36	36	37	38	42
Death	No	No	No	Yes	No

PDA: patent ductus arteriosus; NICU: neonatal intensive care unit.

Antenatal corticosteroid treatment was uncompleted or complete when mother received one or two doses of betamethasone, respectively, within one week and 24 h before delivery.

Apgar test ranged from 1 to 10: less than 5 means risk; up to 7 means normal.

Twin position means the position at birth, 1 being the infant who was nearest to the cervix.

samples of infant 2 at different sampling times and the almost identical species profile of fecal samples from days 7 and 14 of twins 3 and 4.

**3.3. Immunological Analysis.** A wide range of immune compounds were analyzed in plasma and fecal samples of the preterm infants throughout the study. An exploratory screening, using a principal component analysis (PCA) to detect outliers, revealed that the 7th day fecal sample from infant 4 was very different from the rest of the sample sets (data not shown). This infant was suffering a gastric bleeding at this sampling time and, therefore, this sample was excluded from the results of data sets.

Median values of the immune compounds concentrations in meconium and, also, in fecal samples at 7th and 14th days of probiotic supplementation are shown in Table 2. In general, the values obtained for all the immune factors showed a high

interindividual variability in both detection frequencies and amounts. The levels of some immune compounds changed throughout the study; those of IgG<sub>2</sub> and MCP-1 decreased progressively ( $P = 0.074$  and  $P = 0.076$ , resp.) while that of IgA increased (>50 times) from meconium to fecal samples obtained at day 7 after birth ( $P = 0.074$ ) (Table 2). However, only the inflammatory biomarker calprotectin decreased significantly along sampling time ( $P = 0.041$ ).

Plasma concentrations of the immune compounds are shown in Table 3 and, as it can be observed, no significant changes were found. Globally, chemokines and proinflammatory compounds tended to decrease, with the exception of IL-12 and TNF- $\alpha$ . The levels of the latter and those of the anti-inflammatory compounds remained very constant along time. Plasma immunoglobulins also showed a high individual variability although all decreased, with the exception of IgG4 and IgM (Table 3).



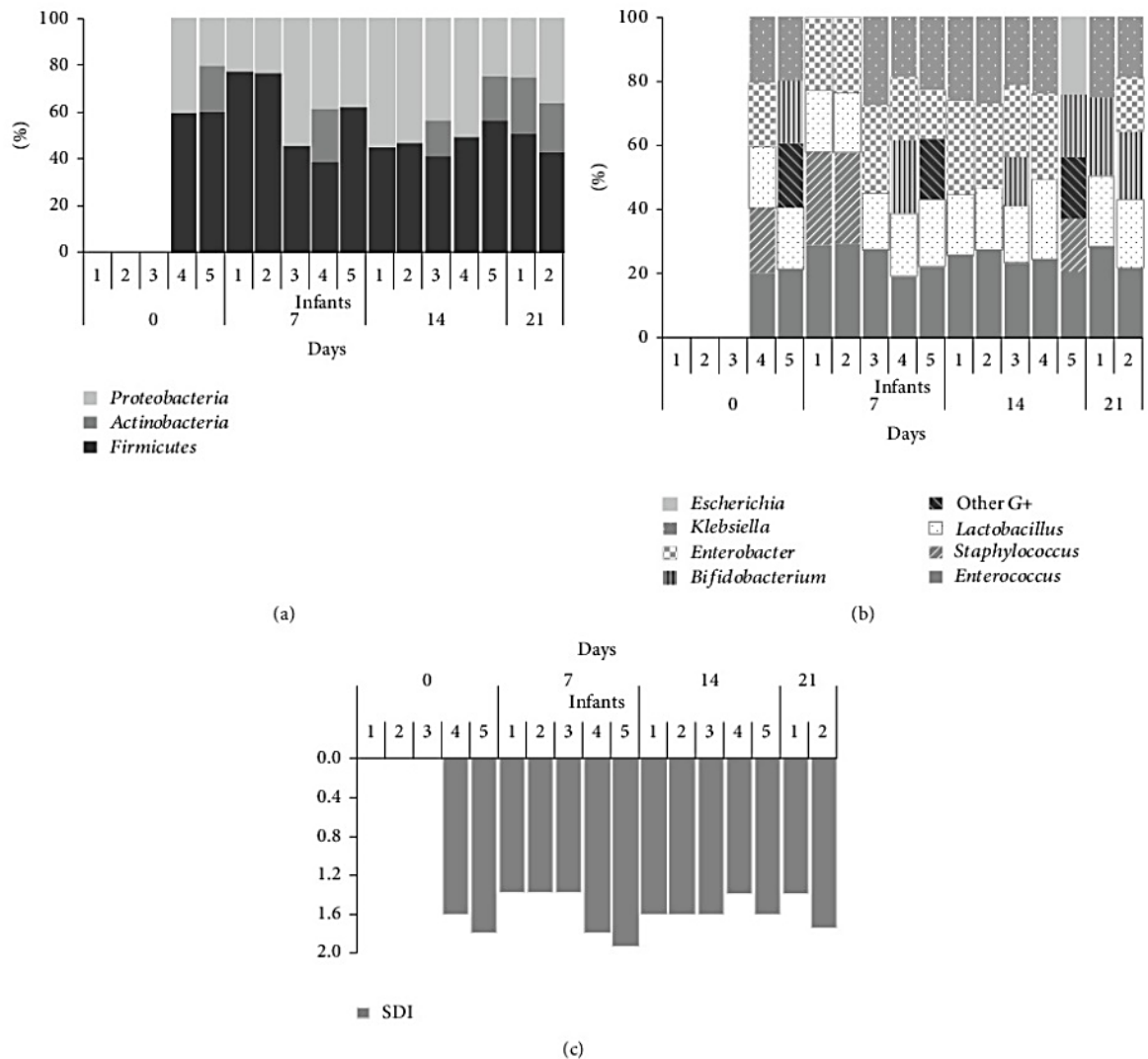


FIGURE 1: Phyla (a), genera (b), and bacterial diversity assessment by the SDI (c) of the microbiota of the meconium and fecal samples analyzed in this study. The relative contributions of the phyla and genera to the microbiota of the infant's gut and the SDI values were labeled per case and sampling time.

The plasma concentrations of the different immune compounds were compared with their respective fecal values. All the immunoglobulins, with the exception of IgA, were significantly different in both types of samples. Among the remaining immune parameters, calprotectin, IL-10, GRO- $\alpha$ , and GM-CSF were significantly higher in feces ( $P = 0.000$ ,  $P = 0.045$ ,  $P = 0.048$ , and  $P = 0.000$ , resp.) while IL-8, MCP-1, and MIP-1 $\beta$  were more abundant in plasma ( $P = 0.012$ ,  $P = 0.000$ , and  $P = 0.001$ , resp.) (Table S2).

**3.4. Multivariate Analysis of the Studied Population.** A multivariate analysis was performed for investigating the possible relationship between clinical features and the immunological and microbiological profiles of fecal and plasma samples.

The clinical variables considered were the following: antibiotic-therapy (Antibiotics); air way resume (AWResume) including ventilation, caffeine, and surfactant treatment; C-RP; hemoglobin amounts (Hb); hematocrit percentage (Hcte); ibuprofen treatment (Ibu.T); ibuprofen doses (Ibu.doses); number of stools per day (N°.stools); nutrition resuming the median feeding type (Nutrition); patent ductus arteriosus (PDA); Sepsis; spontaneous stools (Spont.stools); Transfusion; and Weight.

The redundancy analysis (RDA) of the above-mentioned variables for fecal samples is shown in Figure 2. The obtained model explains the 33% of the variability and the ANOVA test of the model was statistically significant ( $P = 0.020$ ). The meconium samples were located opposite to microbial growth and in coincidence with the constrained antibiotic



TABLE 2: Frequency and concentration of immune compounds in fecal samples ( $N = 14$ ) along time.

	Day 0 ( <i>N</i> = 5)		Day 7 ( <i>N</i> = 4)		Day 14 ( <i>N</i> = 5)		<i>P</i> value*
	<i>n</i> (%)	Median (IQR) (mg/kg)	<i>n</i> (%)	Median (IQR) (mg/kg)	<i>n</i> (%)	Median (IQR) (mg/kg)	
Immunoglobulins							
IgG <sub>1</sub>	5 (100)	3.95 (1.23–6.36)	4 (100)	0.45 (0.23–0.80)	5 (100)	1.26 (0.47–2.43)	0.819
IgG <sub>2</sub>	5 (100)	23.82 (23.19–24.17)	4 (100)	2.98 (2.46–3.97)	5 (100)	2.66 (2.60–3.62)	0.074
IgG <sub>3</sub>	4 (80)	0.02 (0.01–0.02)	1 (25)	0.01 (0.01–0.01)	2 (40)	0.22 (0.11–0.32)	0.424
IgG <sub>4</sub>	5 (100)	0.03 (0.02–0.14)	4 (100)	0.02 (0.01–0.03)	5 (100)	0.03 (0.00–0.06)	0.449
IgM	4 (80)	2.72 (0.19–8.73)	3 (75)	1.10 (0.87–6.00)	5 (100)	2.79 (0.44–10.02)	0.819
IgA	5 (100)	3.57 (0.88–21.73)	4 (100)	201.23 (35.09–356.74)	5 (100)	7.49 (2.96–7.78)	0.074
		(ng/kg)		(ng/kg)		(ng/kg)	
Proinflammatory							
Calprotectin <sup>†</sup>	5 (100)	309.50 (282.00–343.90)	4 (100)	144.80 (132.30–180.40)	5 (100)	38.42 (34.16–63.96)	0.041
IL-1 <sub>β</sub> <sup>‡</sup>	1 (20)	31.47	3 (75)	41.34 (8.00–74.68)	3 (60)	39.20 (–36.24–114.64)	0.937
IL-2	1 (20)	8.47	1 (25)	8.18	0 (0)	—	0.368
IL-6	0 (0)	—	0 (0)	—	1 (20)	27.44	0.368
IL-12 (p70)	2 (40)	29.07 (28.82–29.32)	2 (50)	37.13 (36.38–37.89)	1 (20)	82.98	0.926
IL-17	2 (40)	72.94 (62.76–83.11)	2 (50)	66.08 (64.46–67.71)	2 (40)	69.31 (65.15–73.48)	1.000
IFN-γ	4 (80)	214.90 (190.40–238.30)	4 (100)	299.80 (255.40–320.80)	4 (80)	248.10 (215.80–265.50)	0.449
TNF-α	1 (20)	20.87	0 (0)	—	0 (0)	—	0.368
		(ng/kg)		(ng/kg)		(ng/kg)	
Anti-inflammatory							
IL-4	3 (60)	2.74 (2.43–3.48)	4 (100)	2.63 (2.49–2.85)	3 (60)	2.12 (2.06–2.26)	0.268
IL-5	0 (0)	—	0 (0)	—	0 (0)	—	—
IL-10	1 (20)	25.62	2 (50)	37.21 (35.85–38.57)	3 (60)	39.20 (38.66–53.87)	0.319
IL-13	0 (0)	—	0 (0)	—	0 (0)	—	—
		(ng/kg)		(ng/kg)		(ng/kg)	
Chemokines							
IL-8	4 (80)	20.94 (19.00–23.82)	3 (75)	16.16 (15.56–17.20)	2 (40)	17.05 (16.45–17.64)	0.128
GRO-α <sup>‡</sup>	5 (100)	206.30 (117.04–295.57)	3 (75)	222.10 (–77.61–521.80)	4 (80)	263.50 (261.05–265.88)	0.763
MCP-1	5 (100)	20.08 (15.02–28.89)	2 (50)	18.37 (16.82–19.93)	3 (60)	16.98 (14.21–17.34)	0.076
MIP-1 <sub>β</sub>	5 (100)	53.79 (52.03–68.66)	4 (100)	58.16 (46.46–66.42)	4 (80)	49.60 (35.16–69.89)	0.449
		(ng/kg)		(ng/kg)		(ng/kg)	
Haematopoietic stimuli							
IL-7	0 (0)	—	0 (0)	—	0 (0)	—	—
G-CSF	1 (20)	28.99	0 (0)	—	0 (0)	—	0.368
GM-CSF	5 (100)	1729.00 (1086.00–2312.00)	4 (100)	1830.00 (1648.00–2010.00)	4 (80)	1879.00 (1783.00–1920.00)	0.819

Levels of immune compounds were expressed as median and interquartile range (IQR) when data were not normally distributed and as mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were. \*Friedman test was used to determine the differences between fecal samples along time when data were not normally distributed and one-way ANOVA when they were. †Concentration was expressed as ng/Kg of feces for all the proinflammatory parameters with the exception of calprotectin whose units were mg/Kg. ‡Normally distributed.

vector. Although the rest of fecal samples showed a less clear separation, the evolution of microbial colonization can be observed along the RDA1 axis in coincidence with the constrained vectors for AWResume, Nutrition, Spont.stools, PDA, and Transfusion and in opposite not only with the antibiotics and C-RP vectors, but also with the coordinates of proinflammatory compounds, such as calprotectin, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-8 (Figure 2).

The RDA of plasma samples (Figure 3) explains the 70% of the variability and the ANOVA test of the model was

statistically significant ( $P = 0.010$ ). The bidimensional plot shows two points clearly separated from the others: infant 4 at day 19 and infant 5 at day 7. Three different situations were observed; on the one hand coordinates from infants 1, 2, and 3 did not change among sampling times, while on the other infant 5 showed a normalization far away of proinflammatory variables and hematological parameters coordinates; and finally infant 4 that initially was close to her corresponding twin and the rest of participants appeared at day 19, in the positive RDA1 and RDA2 coordinates, related to

TABLE 3: Frequency and concentration of immune compounds in plasma samples (N = 8) along time.

	Day 7 (N = 3)		Day 14 (N = 5)		P value*
	n (%)	Median (IQR) (mg/L)	n (%)	Median (IQR) (mg/L)	
Immunoglobulins					
IgG <sub>1</sub>	3 (100)	2159.80 (2075.95–2174.30)	5 (100)	1727.30 (1205.50–2029.60)	0.297
IgG <sub>2</sub>	3 (100)	1135.20 (796.03–1147.50)	5 (100)	741.24 (683.84–930.95)	0.456
IgG <sub>3</sub>	3 (100)	52.54 (46.75–64.53)	5 (100)	43.91 (41.35–48.14)	0.297
IgG <sub>4</sub>	3 (100)	23.25 (22.02–67.30)	5 (100)	44.66 (10.59–49.08)	0.655
IgM	3 (100)	263.75 (176.71–934.18)	5 (100)	335.18 (261.41–366.78)	0.882
IgA	3 (100)	27.03 (18.20–40.41)	5 (100)	4.44 (4.00–14.31)	0.101
		(ng/L)	(ng/L)		
Proinflammatory					
Calprotectin <sup>†</sup>	3 (100)	0.86 (0.47–1.11)	5 (100)	0.37 (0.37–0.63)	0.456
IL-1 <sub>β</sub> <sup>‡</sup>	1 (33)	15.81	0 (0)	—	—
IL-2	2 (67)	35.41 (19.34–51.48)	3 (60)	9.70 (6.54–11.23)	1.000
IL-6	3 (100)	24.14 (15.99–65.65)	5 (100)	17.06 (10.10–19.24)	0.297
IL-12 (p70)	3 (100)	27.55 (19.89–91.22)	5 (100)	28.35 (22.71–29.16)	0.882
IL-17	1 (33)	167.20	2 (40)	35.66 (34.65–36.67)	0.221
IFN-γ	2 (67)	670.07 (371.30–968.83)	4 (80)	150.06 (67.73–225.91)	0.643
TNF-α	3 (100)	15.06 (11.35–66.01)	5 (100)	13.14 (11.83–20.40)	0.764
		(ng/L)	(ng/L)		
Anti-inflammatory					
IL-4	3 (100)	1.95 (1.57–7.96)	5 (100)	1.99 (1.69–2.90)	0.882
IL-5	1 (33)	39.43	1 (20)	9.65	0.317
IL-10	3 (100)	11.80 (11.10–69.56)	3 (60)	20.11 (16.02–22.68)	0.513
IL-13	1 (33)	11.27	1 (20)	5.06	0.317
		(ng/L)	(ng/L)		
Chemokines					
IL-8	3 (100)	31.69 (24.45–85.28)	5 (100)	29.76 (22.37–30.79)	0.655
GRO-α <sup>‡</sup>	2 (67)	204.44 (–1859.94–2268.82)	3 (60)	55.42 (45.11–65.73)	0.306
MCP-1	3 (100)	193.91 (123.14–204.59)	5 (100)	88.62 (60.77–192.54)	0.456
MIP-1 <sub>β</sub>	3 (100)	234.90 (210.30–292.20)	5 (100)	174.60 (150.00–250.80)	0.297
		(ng/L)	(ng/L)		
Haematopoietic stimuli					
IL-7	2 (67)	28.14 (17.72–38.57)	3 (60)	10.48 (8.84–12.50)	0.564
G-CSF	3 (100)	30.89 (23.21–96.81)	5 (100)	47.27 (41.84–51.46)	0.655
GM-CSF	3 (100)	248.80 (191.00–299.30)	4 (80)	132.35 (114.97–151.83)	0.157

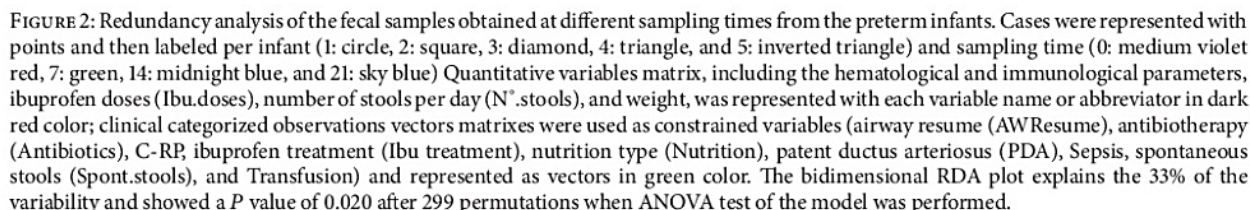
Levels of immune compounds were expressed as median and interquartile range (IQR) when data were not normally distributed and as mean and 95% confidence interval (95% CI) when they were. \* Kruskal-Wallis test was used to determine the differences between blood samples along time when data were not normally distributed and one-way ANOVA test when they were. † Concentration was expressed as ng/L of plasma for all the proinflammatory parameters with the exception of calprotectin whose units were mg/L. ‡ Normally distributed.

constrained variables vectors corresponding to C-RP, Sepsis, and PDA reflecting the clinical worsening of this infant at this moment.

Those clinical categorical variables explained by the fecal and plasma RDAs were used, together with the microbiological, immunological, and clinical parameters, to create two heatmaps, one for each type of samples (Figure 4). The results from all the available fecal samples of the 5 infants were used to perform the heatmap showed in Figure 4(a). The samples' dendrogram shows two arms which clearly separate

meconium and feces. The variables' dendrogram, obtained after samples clustering, shows two principal arms. The lower one is divided into two: the first of them that included clinical variables, some bacterial genera such as *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, and *Paenibacillus*, immunoglobulins IgG<sub>3</sub> and IgG<sub>4</sub>, and cytokines IL-4, IL-13, and IL-2 and the second one that included antibiotherapy, IgG<sub>1</sub>, IL-5, IL-6, and IL-7. The upper arm is also divided and included the rest of the bacterial genera and immunological parameters together with the weight of the infants. The results obtained for all the





available plasma samples from the 5 participants were used to perform the heatmap showed in Figure 4(b). The plasma samples' dendrogram shows two groups, in one of them 2 samples of the infant 2 cluster together with her twin at day 14 and samples of infant 5 clusters together with sample of infant 1 at day 7. In the second arm, siblings 3 and 4 at day 14 of probiotic supplementation initiate the clustering, which ends with sample of day 7 of infant 5 and sample of day 19 of infant 4 as previously observed in Figure 3. The dendrogram related to variables, obtained after infants clustering, showed two principal arms: one of them included clinical variables, hematological parameters, calprotectin, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, immunoglobulins IgA and IgG $_3$ , ibuprofen doses, and Hb and the second principal arm also divided including most of the cytokines, chemokines, and growth factors, the rest of the immunoglobulins, the birth weight, and the Hctc.

In this pilot study, the bacterial composition of fecal samples obtained from five preterm infants supplemented with a probiotic mixture of two strains isolated from human milk during their earlier days of life at the NICU was assessed. In addition, a wide range of cytokines, chemokines, growth factors, and immunoglobulins were determined in all plasma, meconium, and fecal samples in order to describe their immunological profiles, their changes over time, and their potential relationship with bacterial colonization and clinical features.

Up to the present, there has been a complete lack of studies focused on fecal immunological parameters among preterm infants. As a consequence, there are no reference values for this population and, therefore, this study may constitute a starting point for future investigations. Although scarce, there are some studies dealing with blood immune

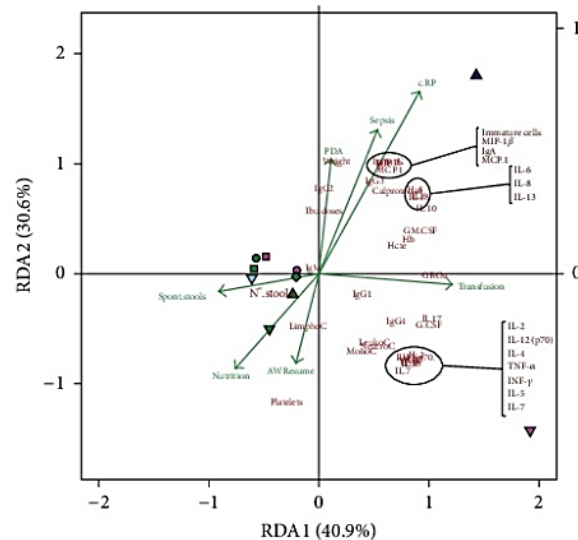


FIGURE 3: Redundancy analysis of the blood samples obtained at different sampling times from the preterm infants. Cases were represented with points and then labeled per infant (1: circle, 2: square, 3: diamond, 4: triangle, and 5: inverted triangle) and sampling time (0: medium violet red, 7: green, 14: midnight blue, and 21: sky blue) Quantitative variables matrix, including the hematological and immunological parameters, ibuprofen doses (Ibu.doses), number of stools per day (N°.stools), and weight, was represented with each variable name or abbreviator in dark red color; clinical categorized observations vectors matrixes were used as constrained variables (airway resume (AWResume), antibiotherapy (Antibiotics), C-RP, ibuprofen treatment (Ibu treatment), nutrition type (Nutrition), patent ductus arteriosus (PDA), Sepsis, spontaneous stools (Spont.stools), and Transfusion) and represented as vectors in green color. The bidimensional RDA plot explains the 71% of the variability and showed a *P* value of 0.010 after 199 permutations when ANOVA test of the model was performed.

compounds in preterm babies. Globally, they show that there are differences in the blood immune profiles depending on the infant gestational age [40–42]. It is important to note that the volume of the blood samples that are usually extracted from preterm neonates for clinical purposes is usually very low. Therefore, multiplex technologies, as the one used in this study, are required in order to be able to simultaneously analyze a high number of immune compounds [42, 43].

The results obtained in this study must be interpreted with caution due to three relevant limitations: the absence of a control group, a very small population size, and the scarcity of previous studies dealing with the immunological features of very low or extremely low weight birth infants and how they may be affected after a probiotic treatment. In this context, the levels of IL-8 found in a previous work focused on term neonates [44] were lower than those obtained in this study while those of IL-4 and IL-6 were similar; in contrast, the values of the remaining immunological parameters were higher in all the sampling times. This may illustrate the immune immaturity of these preterm infants. Similarly, levels of IL-2, IL-6, IL-8, IL-13, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and MCP-1 were lower in preterm infants born at 30–32 weeks than in those born after 36 weeks, indicating a lower stimulation or activation of Th1 cells and antigen-presenting cells in preterm babies as the gestational age decreases [42]. In the present work, the concentrations of the chemokines IL-8 and MCP-1 and those of the cytokines IL-4, IL-10, and IL-13, which are related to anti-inflammatory processes, were higher than those reported for preterm neonates born at 30–32 weeks and

similar to those found in older infants (>36 weeks) [42]. This suggests that the administration of the probiotic strains may exert a modulatory effect on the immune system of these infants.

In addition, very low or extremely low weight birth infants usually require a strong and highly individualized medical intervention (antibiotics, oxygen, corticoids, ibuprofen, transfusions, etc.) for, at least, the first days of life due to a wide variety of life-threatening conditions. Such conditions, together with their corresponding treatments, may alter the microbial gut colonization process and, also, the infants' immune responses. Therefore, it is very difficult to obtain a homogeneous VLBW or ELBW infant population even in cohorts with a high number of infants. This is another important limitation that interventional studies, such as probiotic administration, must face when dealing with such infant subpopulations.

Despite all the limitations cited above, it is also true that a significant reduction of the inflammatory marker calprotectin in feces was observed throughout the probiotic treatment, which is in agreement with previous studies [3, 45, 46]. This is a promising outcome that must be reassessed in the future in a placebo-controlled intervention involving a large cohort.

The increase in IgA observed at day 7 may be due to the microorganisms colonizing the preterm gut, which triggers the production of this Ig by the gut-associated lymphoid tissue (GALT) [47]. IgA has the ability to penetrate the gut mucosal surface in conjunction with antigens and, as a



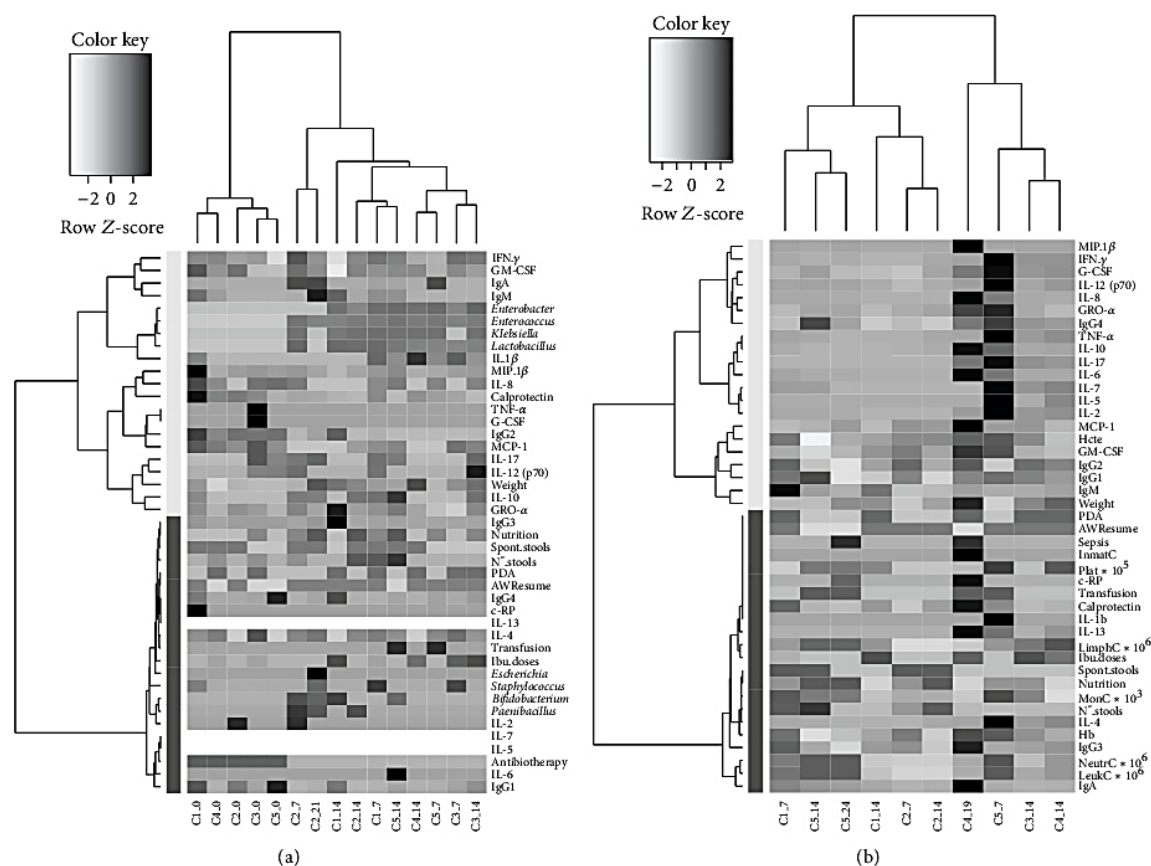


FIGURE 4: Heatmaps of fecal (a) and plasma (b) samples matrixes, considering all the quantitative variables measured and the categorized variables that were explained in the correspondent RDA, were performed. Clustering functions were applied to samples and variables after scaling the whole data set. In order to represent as much information as possible in the plot, the heatmaps were plotted using the measured data matrix scaled per variable and columns were labeled per infant and sampling time.

consequence, to induce effector immune responses, playing a key role in the maintenance of intestinal microbiota and immune homeostasis [48].

The multivariate analysis applied to all the available plasma and fecal samples from the five preterm infants revealed a clear relation between the parameters assessed in this work and the clinical evolution of the infants. In the fecal-related RDA, microbial colonization acted as the principal agent opposed to the levels of certain proinflammatory immunocompounds and in agreement with the clinical variables associated with an improvement of the infants' health. Since bacterial species coordinate coefficients had positive values in the RDA1 axis, calprotectin and other proinflammatory parameters, such as IL-8, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, G-CSF, or TNF- $\alpha$ , showed negative values. RDA1 axis coordinate coefficients for IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, and IgG<sub>4</sub> were negative while those for the secretory IgA and IgM immunoglobulins were positive. Although these findings must be taken with caution due to the inherent limitations of this work and to the high number of potential interactions and confusing factors,

it should be noted that an abnormal gut microbial colonization predisposes the neonatal intestine to inflammation and to a cascade of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines responses [49]. On the other hand, the evolution of the infants' microbiota was different than that observed in other preterm infants devoid of probiotic treatment [7] but similar to that of preterm neonates that received probiotics [23].

Finally, the dendrograms obtained for samples and variables represented in the heatmaps (Figure 4) seem to reinforce the hypothesis that probiotic strains may contribute to the development of a normal gut bacterial colonization and that this process is essential to reduce the health burden associated with prematurity [50, 51]. Although the present cohort was very small, a promising influence of the probiotic supplementation on gut colonization was observed, including an increase in bacterial diversity and in the presence of lactobacilli and bifidobacteria at relatively high levels.

Although multicenter, randomized clinical trials involving bigger cohorts and longer intervention times with

these strains will be required to determine their efficacy in the prevention of sepsis or NEC, the results of this work may provide useful information for future studies dealing with probiotic gut colonization and, particularly, with the detection and quantification of fecal and blood immunocompounds in preterm infants.

### Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

### Authors' Contribution

Laura Moles, Esperanza Escribano, and Javier de Andrés contributed equally to this work.

### Acknowledgments

This work was supported by the Projects CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010) and AGL2010-15420 from the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain). Laura Moles is the recipient of a predoctoral grant from the same ministry. The authors would like to thank Pilar Amo and Milagros Gil for their contribution to samples and clinical data collection. Also their acknowledgement is due to the parents of the participants.

### References

- [1] F. Magne, M. Abély, F. Boyer, P. Morville, P. Pochart, and A. Suau, "Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 57, no. 1, pp. 128–138, 2006.
- [2] Y. Wang, J. D. Hoenig, K. J. Malin et al., "16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis," *ISME Journal*, vol. 3, no. 8, pp. 944–954, 2009.
- [3] C. Rougé, O. Goldenberg, L. Ferraris et al., "Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods," *Anaerobe*, vol. 16, no. 4, pp. 362–370, 2010.
- [4] M. S. LaTuga, J. C. Ellis, C. M. Cotton et al., "Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 12, Article ID e27858, 2011.
- [5] S. Arboleya, A. Binetti, N. Salazar et al., "Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates," *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 79, no. 3, pp. 763–772, 2012.
- [6] J. C. Hallab, S. T. Leach, L. Zhang et al., "Molecular characterization of bacterial colonization in the preterm and term infant's intestine," *Indian Journal of Pediatrics*, vol. 80, no. 1, pp. 1–5, 2013.
- [7] L. Moles, M. Gómez, H. Heilig et al., "Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 6, Article ID e66986, 2013.
- [8] R. Martín, A. J. Nauta, K. Ben Amor, L. M. Knippels, J. Knol, and J. Garssen, "Early life: gut microbiota and immune development in infancy," *Beneficial microbes*, vol. 1, no. 4, pp. 367–382, 2010.
- [9] J. L. Kaplan, H. N. Shi, and W. A. Walker, "The role of microbes in developmental immunologic programming," *Pediatric Research*, vol. 69, no. 6, pp. 465–472, 2011.
- [10] P. van Baarlen, J. M. Wells, and M. Kleerebezem, "Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli," *Trends in Immunology*, vol. 34, no. 5, pp. 208–215, 2013.
- [11] A. A. Sharma, R. Jen, A. Butler, and P. M. Lavoie, "The developing human preterm neonatal immune system: a case for more research in this area," *Clinical Immunology*, vol. 145, no. 1, pp. 61–68, 2012.
- [12] E. C. Claud and W. A. Walker, "Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis," *The FASEB Journal*, vol. 15, no. 8, pp. 1398–1403, 2001.
- [13] M.-F. de la Cochetière, H. Piloquet, C. des Robert, D. Darmaun, J.-P. Galmiche, and J.-C. Rozé, "Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: the putative role of *Clostridium*," *Pediatric Research*, vol. 56, no. 3, pp. 366–370, 2004.
- [14] M.-J. Butel, A. Suau, F. Campeotto et al., "Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 44, no. 5, pp. 577–582, 2007.
- [15] J. C. Madan, R. C. Salari, D. Saxena et al., "Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis," *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, vol. 97, no. 6, pp. F456–F462, 2012.
- [16] A. Janvier, J. Malo, and K. J. Barrington, "Cohort study of probiotics in a North American neonatal intensive care unit," *Journal of Pediatrics*, vol. 164, no. 5, pp. 980–985, 2014.
- [17] N. D. Embleton and T. Skeath, "Probiotics for preterm infants on the NICU," *Paediatrics and Child Health*, vol. 24, no. 1, pp. 38–40, 2014.
- [18] Q. Wang, J. Dong, and Y. Zhu, "Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: an updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials," *Journal of Pediatric Surgery*, vol. 47, no. 1, pp. 241–248, 2012.
- [19] G. Deshpande, S. Rao, S. Patole, and M. Bulsara, "Updated meta-analysis of probiotics for preventing necrotizing enterocolitis in preterm neonates," *Pediatrics*, vol. 125, no. 5, pp. 921–930, 2010.
- [20] W. O. Tarnow-Mordi, D. Wilkinson, A. Trivedi, and J. Brok, "Probiotics reduce all-cause mortality and necrotizing enterocolitis: it is time to change practice," *Pediatrics*, vol. 125, no. 5, pp. 1068–1070, 2010.
- [21] H.-C. Lin, C.-H. Hsu, H.-L. Chen et al., "Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial," *Pediatrics*, vol. 122, no. 4, pp. 693–700, 2008.
- [22] M. G. Romeo, D. M. Romeo, L. Trovato et al., "Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: Incidence of late-onset sepsis and neurological outcome," *Journal of Perinatology*, vol. 31, no. 1, pp. 63–69, 2011.
- [23] R. Mohan, C. Koebeck, J. Schildt et al., "Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 11, pp. 4025–4031, 2006.



- [24] Y. Ohashi and K. Ushida, "Health-beneficial effects of probiotics: its mode of action," *Animal Science Journal*, vol. 80, no. 4, pp. 361–371, 2009.
- [25] M. Millar, M. Wilks, P. Fleming, and K. Costeloe, "Should the use of probiotics in the preterm be routine?" *Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition*, vol. 97, no. 1, pp. F70–F74, 2012.
- [26] E. A. Cristofalo, R. J. Schanler, C. L. Blanco et al., "Randomized trial of exclusive human milk versus preterm formula diets in extremely premature infants," *The Journal of Pediatrics*, vol. 163, no. 6, pp. 1592.e1–1595.e1, 2013.
- [27] A. F. Ahribi and R. J. Schanler, "Human milk is the only milk for premies in the NICU!," *Early Human Development*, vol. 89, no. 2, pp. S51–S53, 2013.
- [28] D. I. Tudehope, "Human milk and the nutritional needs of preterm infants," *Journal of Pediatrics*, vol. 162, no. 3, pp. S17–S25, 2013.
- [29] I. Levy, J. Comarsca, M. Davidovits, G. Klinger, L. Sirota, and N. Linder, "Urinary tract infection in preterm infants: the protective role of breastfeeding," *Pediatric Nephrology*, vol. 24, no. 3, pp. 527–531, 2009.
- [30] R. J. Schanler, C. Lau, N. M. Hurst, and E. O. Smith, "Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants," *Pediatrics*, vol. 116, no. 2, pp. 400–406, 2005.
- [31] R. Martín, M. Olivares, M. L. Marín, L. Fernández, J. Xaus, and J. M. Rodríguez, "Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk," *Journal of Human Lactation*, vol. 21, no. 1, pp. 8–17, 2005.
- [32] R. Martín, E. Jiménez, H. Heilig et al., "Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 75, no. 4, pp. 965–969, 2009.
- [33] L. Fernández, S. Langa, V. Martín et al., "The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease," *Pharmacological Research*, vol. 69, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [34] M. Gueimonde, K. Laitinen, S. Salminen, and E. Isolauri, "Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation?" *Neonatology*, vol. 92, no. 1, pp. 64–66, 2007.
- [35] G. Solís, C. G. de los Reyes-Gavilan, N. Fernández, A. Margolles, and M. Gueimonde, "Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut," *Anaerobe*, vol. 16, no. 3, pp. 307–310, 2010.
- [36] S. Arbolea, P. Ruas-Madiedo, A. Margolles et al., "Characterization and *in vitro* properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk," *International Journal of Food Microbiology*, vol. 149, no. 1, pp. 28–36, 2011.
- [37] V. Martín, A. Maldonado-Barragán, L. Moles et al., "Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces," *Journal of Human Lactation*, vol. 28, no. 1, pp. 36–44, 2012.
- [38] M. Mshvildadze, J. Neu, J. Shuster, D. Theriaque, N. Li, and V. Mai, "Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques," *Journal of Pediatrics*, vol. 156, no. 1, pp. 20–25, 2010.
- [39] C. Greenwood, A. L. Morrow, A. J. Lagomarcino et al., "Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of *Enterobacter*," *The Journal of Pediatrics*, vol. 165, no. 1, pp. 23–29, 2014.
- [40] A. Blanco-Quirós, E. Arranz, G. Solis, A. Villar, A. Ramos, and D. Coto, "Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns," *European Journal of Pediatrics*, vol. 159, no. 6, pp. 420–423, 2000.
- [41] N. Matoba, N. Yu, K. Mestan et al., "Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age," *Pediatrics*, vol. 123, no. 5, pp. 1320–1328, 2009.
- [42] S. Lusiyati, C. V. Hulzebos, J. Zandvoort, H. Sukandar, and P. J. J. Sauer, "Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis," *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, vol. 6, no. 2, pp. 153–163, 2013.
- [43] N. Takahashi, R. Uehara, M. Kobayashi et al., "Cytokine profiles of seventeen cytokines, growth factors and chemokines in cord blood and its relation to perinatal clinical findings," *Cytokine*, vol. 49, no. 3, pp. 331–337, 2010.
- [44] G. Hodge, S. Hodge, R. Haslam et al., "Rapid simultaneous measurement of multiple cytokines using 100  $\mu$ l sample volumes—Association with neonatal sepsis," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 137, no. 2, pp. 402–407, 2004.
- [45] S. Josefsson, S. K. Bunn, and M. Domellöf, "Fecal calprotectin in very low birth weight infants," *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, vol. 44, no. 4, pp. 407–413, 2007.
- [46] G. Aydemir, F. Cekmez, I. A. Tanju et al., "Increased fecal calprotectin in preterm infants with necrotizing enterocolitis," *Clinical Laboratory*, vol. 58, no. 7–8, pp. 841–844, 2012.
- [47] K. Suzuki, S.-A. Ha, M. Tsuji, and S. Fagarasan, "Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut," *Seminars in Immunology*, vol. 19, no. 2, pp. 127–135, 2007.
- [48] T. Rogosch, S. Kerzel, K. Hoß et al., "IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection," *The Journal of Immunology*, vol. 189, no. 11, pp. 5449–5456, 2012.
- [49] V. Mai, R. M. Torrazza, M. Ukhanova et al., "Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 1, Article ID e52876, 2013.
- [50] V. Mai, C. M. Young, M. Ukhanova et al., "Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 6, Article ID e20647, 2011.
- [51] R. H. Siggers, J. Siggers, T. Thymann, M. Boye, and P. T. Sangild, "Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 22, no. 6, pp. 511–521, 2011.

IV.6. Safety and tolerance of three probiotic strains in healthy infants: a multi-centre randomized, double-blind, placebo-controlled trial

Manzano S, de Andrés J, Castro I, Rodríguez JM, Jiménez E, Espinosa-Martos I.

Benef Microbes. 2017 Aug 24;8(4):569-578. doi: 10.3920/BM2017.0009. Epub 2017 May 30.



## Safety and tolerance of three probiotic strains in healthy infants: a multi-centre randomized, double-blind, placebo-controlled trial

S. Manzano<sup>1,2#</sup>, J. De Andrés<sup>1#</sup>, I. Castro<sup>1</sup>, J.M. Rodríguez<sup>1,2</sup>, E. Jiménez<sup>1,2</sup> and I. Espinosa-Martos<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de hierro s/n, 28040 Madrid, Spain; <sup>2</sup>Probisearch S.L.U., C/ Santiago Grisolia, 2, 28760 Tres Cantos, Spain; <sup>#</sup>Both authors contributed equally; irene.espinosa@probisearch.com

Received: 20 January 2017 / Accepted: 29 January 2017

© 2017 Wageningen Academic Publishers

OPEN ACCESS



RESEARCH ARTICLE

### Abstract

Some strains of species belonging to the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are used in order to maintain health. Although these organisms have a long record of safe use, it is important to assess their safety and tolerance in potentially vulnerable populations, such as infants. The objective of this study was to evaluate the safety and tolerance of three probiotic strains (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* R0033, *Bifidobacterium bifidum* R0071 and *Lactobacillus helveticus* R0052) in healthy infants aged 3 to 12 months. A multi-centre randomized, double-blind, placebo-controlled intervention study with 221 healthy full-term infants was conducted. Infants received either a placebo or one of the 3 probiotic strains ( $3 \times 10^9$  cfu) daily during an 8 week intervention period. Growth (weight, height and head circumference), adverse events (AEs)/serious adverse events (SAEs), concentrations of D-lactic acid in urine samples, characteristics of the stools and use of medication were collected for safety evaluation. All 4 groups were homogeneous with respect to age, gender, feeding type, ethnicity, height, weight and head circumference at the start of the study. The results showed that changes in growth (weight, height and head circumference) were equivalent in all 4 groups. No SAEs were reported. Total number of AEs recorded was equivalent in all groups. Thus, the use of *B. infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 and *B. bifidum* R0071 in infancy is safe, and well tolerated.

**Keywords:** clinical trial, probiotics, healthy infants, safety and tolerance

### 1. Introduction

The Food and Agriculture Organization (FAO) and the World Health Organization (WHO) define probiotics as 'live microorganisms, which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host' (FAO/WHO, 2002). The *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* genera are the most widely used probiotic bacteria and are included in many functional foods and dietary supplements (Frick *et al.*, 2007; Goubeyre *et al.*, 2011; Macpherson and Harris, 2004). One of the mechanism by which *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are thought to inhibit the growth of pathogenic microorganisms is through the production of lactic, acetic, and other organic acids, with a consequent decrease of intraluminal pH. Moreover, *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains may produce other antimicrobial compounds and compete with potentially pathogenic

bacteria for nutrients and epithelial adhesion sites (Braegger *et al.*, 2011).

Probiotics are increasingly being administered to infants with the intention of improving health and, in fact, probiotic therapies are entering the therapeutic mainstream of paediatric diseases (Van Niel, 2005). The administration of probiotics as a single-species or as a multi-species product, in supplements or in follow-on infant formula given beyond early infancy may be associated with some health benefits. Studies have shown a reduction in the risk of non specific gastrointestinal infections, a reduced risk of antibiotic use, and a lower frequency of colic and/or irritability (Braegger *et al.*, 2011). Furthermore, it has been demonstrated that the use of certain *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* probiotic strains reduces the risk of diarrhoea in infants and the incidence of respiratory infections and acute otitis media



during the first year of life when compared with placebo (Chouraqui *et al.*, 2004; Rautava *et al.*, 2009; Szajewska *et al.*, 2001). Probiotics have also been demonstrated to be effective in the prevention of atopic dermatitis, reducing the risk by half compared with placebo (Kalliomäki *et al.*, 2001).

Probiotic blends have been administered to a large number of healthy infants in research studies without reported adverse events (AEs) but these studies were mostly efficacy studies looking at the different safety parameters only as a secondary outcome. In this context, studies in children (1 to 7 years old) with the combination of the probiotic strains *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* R0033, *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium bifidum* R0071 have found an improvement in their health compared with placebo (Cazzola *et al.*, 2010a,b; Mei and Chen, 2008). Recent cases of bacteraemia by *Lactobacillus* or *Bifidobacterium* in preterm, term infants and children have been reported (Bertelli *et al.*, 2015; Dani *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 2001). Although the patients with infections in these studies have had underlying conditions predisposing them to infection some species of lactobacilli can induce serious infections, including sepsis, pneumonia, and meningitis in compromised newborns and children (Dani *et al.*, 2016). Consequently, it is important to assess the safety and tolerance of single strains in a potentially more vulnerable population, such as infants (Braegger *et al.*, 2011).

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the safety and tolerance of 3 probiotic strains (*B. longum* subsp. *infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 and *B. bifidum* R0071) in healthy infants from 3 to 12 months in a randomised, double-blind, placebo-controlled study.

## 2. Materials and methods

### Study design

A multi-centre randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, intervention study with 4 groups was conducted between June 2014 and April 2015 in health care centres from different areas of Madrid, Spain. Ethical committee approval was obtained from Hospital Universitario La Paz on 26 May 2014 (reference 4176). Written informed consent was obtained from the parents or legal guardians. The duration of the study was 12 weeks, divided into 3 different periods; 2 weeks run-in, 8 weeks treatment and 2 weeks follow-up (Figure 1).

During the study, 4 visits were conducted by the investigators/paediatricians: (1) at the start of the study (visit 1); (2) at the end of the run-in period (visit 2); (3) at the end of the treatment period (visit 3); and (4) at the end of the follow-up period (visit 4, Figure 1). The following data were collected at the study visits: type of feeding, growth parameters and events related to the health behaviour of the infant, non-scheduled visits resulting from a health problem, serious

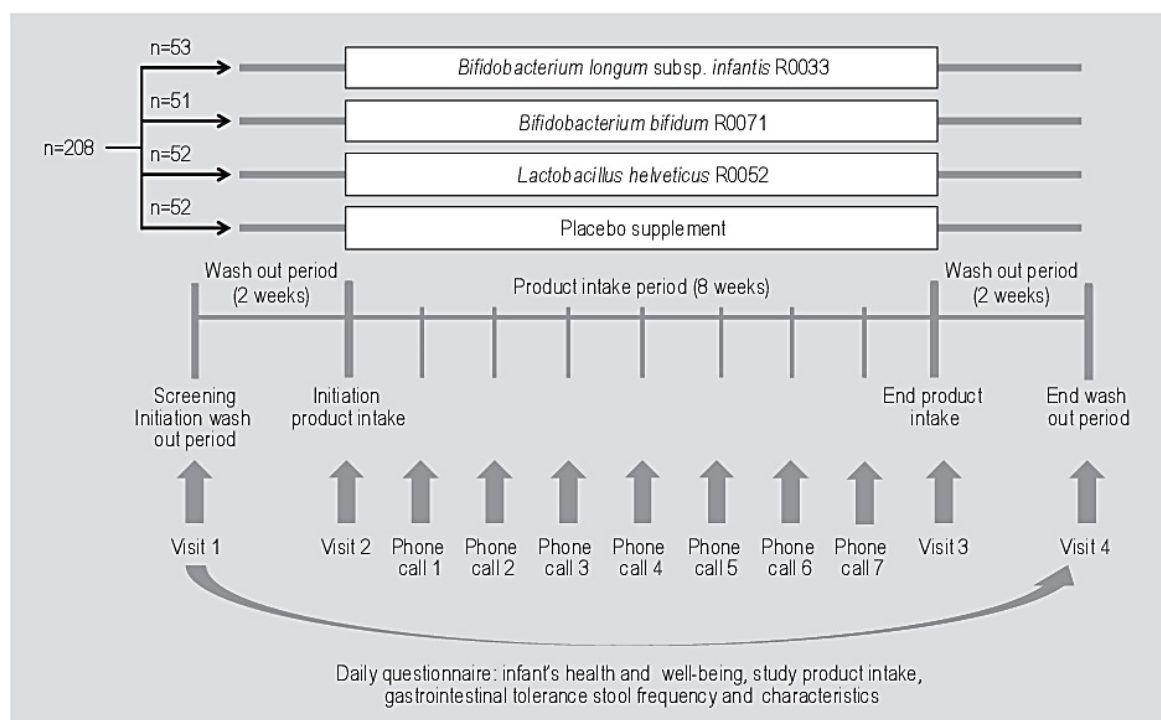


Figure 1. Schematic diagram of the study.

(S)AEs and concomitant medication. Additionally, weekly phone calls (n=7) were made during the treatment period in order to collect relevant data related to possible (S)AEs and to the infant's well-being (change in sleep behaviour, crying time, fever episodes, rashes, diarrhoea, unexpected visits to the doctor and antibiotic prescription).

Further, parents were instructed to complete a daily questionnaire to record the general health of the infant, day care attendance, type of feeding, introduction of new foods, vaccination and stools characteristics using the Amsterdam Stool Chart (Bekkali *et al.*, 2009). All the completed questionnaires and the unused study products were collected at visit 4. The study was conducted in accordance with the 'World Medical Association Declaration of Helsinki' (64<sup>th</sup> WMA General Assembly, Fortaleza, Brazil, October 2013).

### Subjects

The recruited participants met the following inclusion criteria: healthy, full-term ( $\geq 37$  weeks gestation at birth) and aged between 3 to 12 months old. The exclusion criteria were history of gastrointestinal (GI) disorders, GI surgery, metabolic disorders, immune deficiency, heart failure and/or cardiac medical history, surgery within one month prior to inclusion and antibiotic prescription one week before inclusion and during the wash out period. Investigators also excluded infants that had recently participated in other trials. Additionally, the use of probiotic supplements or probiotic infant formula during their participation in the study was not allowed.

The randomization was stratified for age and gender in order to obtain a homogeneous population for the 4 groups (*B. infantis* R0033; *B. bifidum* R0071; *L. helveticus* R0052 or placebo).

### Study product

The investigational products were supplied by Lallemand Health Solutions (Montreal, Canada) as a fine white powder (1.5 g) packed in sealed sachets containing  $3 \times 10^9$  cfu of either *B. infantis* R0033, *L. helveticus* R0052, *B. bifidum* R0071 (freeze-dried) and potato starch as the excipient. The placebo contained only the excipient and the appearance was the same as the probiotic products. Each participant received one sachet diluted in 10 ml water, breast milk or infant formula per day for a period of 8 weeks. Compliance with product intake was recorded by the parents in the daily questionnaire.

### Study outcomes

The safety and tolerance outcomes of the study growth (weight, height and head circumference), (serious) adverse events ((S)AEs) and use of medication were assessed

by the investigators/paediatricians during visits 1, 2, 3 and 4. Concentration of D-lactic acid was measured in urine samples collected during visits 1, 2, 3 and 4. The characteristics of the stools; frequency, quantity, consistency and colour were recorded daily by the parents according to the Amsterdam scale (Bekkali *et al.*, 2009). D-lactic acid amounts and stool characteristics were both also considered as safety and tolerance outcomes. Additionally, feeding option, childcare centre attendance and vaccination were also assessed. The enrolment questionnaire filled during visit 1 included following data: date of birth, age at inclusion, type of delivery, gender, ethnicity, feeding type and medical history.

AEs were defined as any untoward medical occurrence in an enrolled infant which does not necessarily have a causal relationship with the study product (FDA, 2016). All AEs were recorded and evaluated by the investigators/paediatricians for causality and severity. The AEs were assessed as SAEs if they were life-threatening, caused permanent harm, resulted in hospitalization or prolongation of existing hospitalization or resulted in persistent or significant disability or incapacity. All AEs were coded according to the Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA).

### Concentration of D- lactic acid in urine samples

Urinary D-lactate concentration was determined using D-lactic acid/ L-lactic acid UV-method R-Biopharm kit (Darmstadt, Germany). Known amounts of D- and L-lactic acid were used as internal standard according to the recommendations of manufacturer of the kit used.

### Statistical methods for data analysis

Sample-size calculation was based on the primary outcome: infant growth during the study period. The objective was to show equivalence in weight gain of at least 6 g per day, a value that represented the minimum clinically relevant difference in weight (Koletzko *et al.*, 2009; R  ih   *et al.*, 2002). Thus, the sample size estimated for assessing equivalence with a minimum weight gain of 6 g/day, with an alpha-level of 0.025 (two pairwise comparisons) and a statistical power of 80%, was 200 subjects (50 for each of the four groups). Assuming a dropout rate of approximately 10%, the total number of subjects to be included in the study was rounded off to 220. The sample-size calculation was performed with PASS 13, NCSS (Utah, USA).

In this study, an equivalence hypothesis was used for assessing growth, AEs, stool characteristics and other safety data recorded between the probiotic groups and the placebo. This means that the tested hypothesis was set forth to assess the following:  $H_0: |\mu_{\text{control}} - \mu_{\text{treated}}| \geq \epsilon$ ;  $H_1: |\mu_{\text{control}} - \mu_{\text{treated}}| < \epsilon$ ; thus when  $P < 0.05$ , the  $H_0$  was



rejected and groups were equivalent. According to the official growth tables of the Spanish Society for Paediatrics (AEP), the minimal clinical difference ( $\epsilon$ ) tolerated for growth are 6 g/day of weight gain, an increase of 0.05 cm/day in height and 0.018 cm/day for head circumference: so, these parameters were used to assess the equivalence between the different arms of the study. The other safety outcomes were analysed per week, so the results were expressed for each week of the study (Plaza-Díaz *et al.*, 2013; Wind *et al.*, 2010). Ordered-categorical variables and binary categorical data (yes/no) were analyzed by calculating the Z-statistic as described by Da Silva *et al.* (2008) and Mascha and Sessler (2011). For this purpose, the predetermined specified practical difference threshold of 1 was used for the ordered-categorical variables. Using different values for 'a biologically relevant statistical difference', Da Silva *et al.* (2008) established that 10% is the value that gives the best compromise between high statistical power and a low sample size, when equivalence testing for binary outcomes has to be evaluated. Therefore, the proportion of affirmative answers and a significant biological difference of 10% were employed for the analysis of the binary categorical data.

For the Intention To Treat (ITT) analysis, data from all randomly assigned infants who entered the study during the 12-week period was used. In contrast, the Per Protocol (PP) analysis excluded data from those subjects that during the study did not ingest the tested product for >3 consecutive days or 1 day per week, as stated in the protocol. The primary outcome was analysed in both the ITT and PP populations.

Prior to any other statistical analysis, general linear mixed models and post hoc ANOVA test of the model were used to assess any possible relationship of the confounding factors (age at inclusion and gender) with the arm of the study for all the outcomes. The same models were considered for different covariates (feeding type and new food introduction) with other outcomes (stool characteristics and possible relationships between fever and vaccines or unscheduled visits to the doctor). Only when a relevant relationship was obtained it was mentioned.

Statistical analyses were conducted using the Statgraphics Centurion XVII (version 17.0.16, Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) and R (version 3.0.2, R-project, <http://www.R-project.org>) software. Some statistics were directly calculated on MS Excel spreadsheets (Microsoft, Redmond, WA, USA), such as the z-statistic (Da Silva *et al.*, 2008; Mascha and Sessler, 2011).

### 3. Results

#### Study population

In this study, 221 infants were recruited and 202 completed the study (95 males and 103 females). Nineteen subjects withdrew, 13 of them before randomization (visit 2) and 6 during the treatment period (Figure 2). Four subjects did not comply with the product intake which meant a protocol deviation, and were therefore eliminated from the PP group. The results of the PP analysis are presented and include data collected during the treatment period of 198 infants.

Demographic characteristics of subjects recruited at the beginning of the study (visit 1) are shown in Table 1. No statistical differences in demographics were observed among the four arms of the study resulting in 4 homogeneous groups.

#### Growth parameters: weight, height and head circumference

Weight, height and head circumference were measured at all visits and the changes in anthropometric measures showed equivalence for each of the 3 treatment groups when compared to the placebo (Table 2).

#### Adverse events

No SAEs were recorded during the study. Recorded AEs of all participants who completed the study were classified according to the System Organ Class (SOC) of MedDRA and are shown in Table 3. A lack of power was observed when performing the statistical analysis. The z-statistic could only be calculated for the total number of AEs and the total number of participants with at least 1 AE per group. For the PP population significant equivalence to the placebo was observed in all 3 groups (Table 3). For the ITT population only the *B. infantis* R0033 group showed a total number of AEs not equivalent to that found in the placebo group ( $P=0.085$ ). This non-equivalence was due to the high number of AEs ( $n=9$ ) registered by one of the participants of the *B. infantis* R0033 group who was noncompliant with the product intake: 2 gastrointestinal; 4 respiratory, thoracic and mediastinal; 1 eye and 1 skin and subcutaneous tissue disorders; and 1 episode of fever, all these AEs were not related to product intake. Further, such non-equivalence was not detected for the number of participants with at least one AE ( $P\leq 0.001$ ) or the number of 'possibly related' AEs (Table 3).

#### Gastro-intestinal symptoms, fever, rashes

Safety data were collected during study visits, phone calls and daily questionnaires. The frequencies of affirmative (yes) answers to questions regarding gastrointestinal symptoms

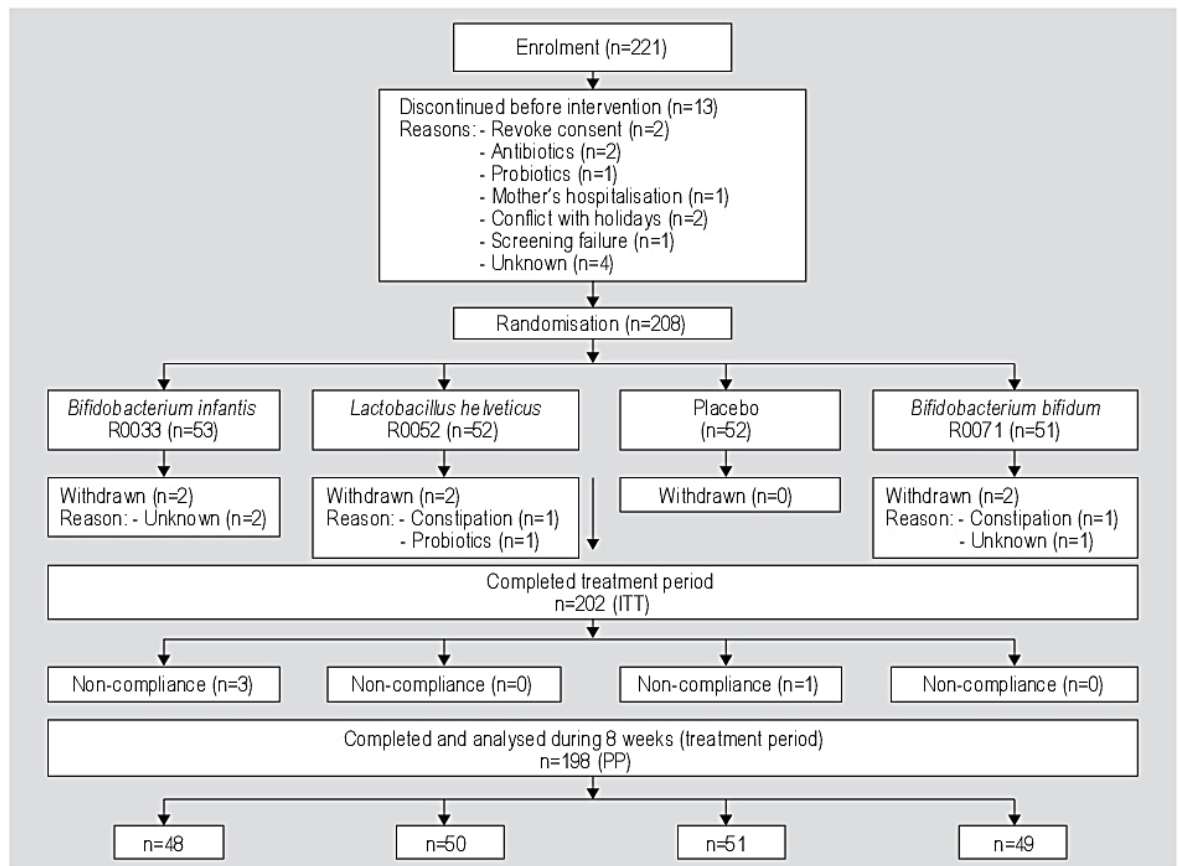


Figure 2. Flow chart of the study.

(diarrhoea), fever, rashes and unscheduled visits to doctor were registered weekly during the treatment period and at visits 3 and 4 for all the participants (Table 4). The results showed a low incidence in all of these safety variables for all 4 groups of the study, and were below the statistical biological difference of 10% (Da Silva *et al.*, 2008). Nevertheless, although the equivalence analysis could not be done, the behaviour of the treatment groups was similar to that observed for the control group. These results were also cross-examined with the daily questionnaires completed by the parents. No discordance was found between both sources of data (data not shown).

#### Changes in sleep and crying patterns

Changes in sleep and crying patterns, as general indicators of health status, were recorded in the daily questionnaires (Table 4). The incidence of these indicators was below the statistical biological difference of the 10% and was homogenous amongst all study groups (Da Silva *et al.*, 2008).

#### Concentration D-lactic acid in the urine samples

The concentration of D-lactic acid measured in urine samples from visits 1, 2, 3 and 4 were below the quantification limit of the method (33  $\mu$ M) for all the tested samples (data not shown).

#### Stool characteristics

Daily characteristics of the stools were recorded by the parents according to the Amsterdam stool scale (Bekkali *et al.*, 2009). The statistical equivalence test of the weekly average records showed that the infants' stool characteristics in any of the three probiotic groups were equivalent to those of the placebo group (Table 5).

#### Use of medication

According to the data collected at visit 1, a low number of participants (6 infants) had concomitant medication and were randomly distributed in all four groups of the study. During the study period, 2 participants (1 in the *L. helveticus* R0052 group and the other in the *B. bifidum* R0071 group) used topical antibiotics.

S. Manzano et al.

**Table 1. Demographic characteristics of the participants at the beginning of the study.<sup>a</sup>**

	<i>Bifidobacterium infantis</i> R0033	<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052	<i>Bifidobacterium bifidum</i> R0071	Placebo	P-value
Type of birth					0.478 <sup>b</sup>
Vaginal	40	38	36	42	
C-section	8	12	13	9	
Gender					0.859 <sup>b</sup>
Male	22	25	22	26	
Female	26	25	27	25	
Feeding type					0.720 <sup>b</sup>
Mother's milk	11	12	10	17	
Mixed	19	21	24	20	
Formula	18	17	15	14	
Ethnicity					0.383 <sup>b</sup>
Caucasian	48	49	49	51	
Others	0	1	0	0	
Age at inclusion (months)	6.00 (4.50-8.50)	6.50 (5.00-9.00)	7.00 (4.00-8.00)	6.00 (4.75-8.00)	0.948 <sup>c</sup>
Height (cm)	66.50 (62.25-71.00)	68.50 (64.25-71.00)	67.00 (65.00-71.00)	67.25 (63.87-70.00)	0.765 <sup>c</sup>
Weight (kg)	7.44±1.28	7.58±1.13	7.59±0.98	7.55±1.22	0.914 <sup>d</sup>
Head circumference (cm)	43.00 (41.60-44.75)	43.75 (42.00-45.00)	43.00 (42.00-44.00)	43.25 (41.50-44.12)	0.834 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Data are expressed as total frequencies for categorical outcomes; median (25Q-75Q) for quantitative outcomes not normally distributed and mean ± standard deviation when normally distributed.

<sup>b</sup>  $\chi^2$  test.

<sup>c</sup> Kruskal-Wallis test.

<sup>d</sup> ANOVA test.

**Table 2. Evaluation of growth (height, weight and head circumference) of the participants during the intervention period.<sup>a</sup>**

Treatment (56 <sup>th</sup> day)	<i>Bifidobacterium infantis</i> R0033	<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052	<i>Bifidobacterium bifidum</i> R0071	Placebo
Height (cm)	2.50 (2.00-3.40) <sup>b</sup>	2.60 (2.00-3.45) <sup>b</sup>	3.00 (2.00-3.80) <sup>b</sup>	3.00 (2.00-4.00)
Weight (kg)	0.79 (0.57-0.90) <sup>b</sup>	0.71 (0.49-0.90) <sup>b</sup>	0.63 (0.46-0.80) <sup>b</sup>	0.70 (0.56-0.98)
Head circumference (cm)	1.00 (1.00-1.85) <sup>b</sup>	1.00 (1.00-2.00) <sup>b</sup>	1.00 (1.00-2.00) <sup>b</sup>	1.00 (1.00-2.00)

<sup>a</sup> The change between visit 2 and 3 was expressed as median (25Q-75Q) for the recorded outcome.

<sup>b</sup> Significant equivalence with a 95% confidence level ( $P < 0.05$ ) when compared with the placebo group using a non-parametric test-test.

## 4. Discussion

*B. infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 and *B. bifidum* R0071 are strains with probiotic characteristics which have been shown to exert beneficial effects in animal models and in infants from 1 to 7 years of age (Cazzola *et al.*, 2010a,b; Mei *et al.*, 2008; Wine *et al.*, 2009). In the present study, the safety and tolerance of these probiotic strains was assessed in healthy infants aged 3 to 12 months over an intervention period of 8 weeks.

Growth is an essential outcome when evaluating the safety of probiotics as it is a sensitive, although nonspecific, sign of the overall health and nutritional status of an infant. Generally, growth studies should include measurements of, at least, weight, length and head circumference (Szajewska *et al.*, 2013). In this clinical study, the growth of all the participants was equivalent irrespective of the study product they consumed. These results are in agreement with those observed in other studies which reported that



**Table 3. Adverse events for all participants that completed the study classified according to the System Organ Class (SOC) of the MedDRA.<sup>a</sup>**

Body system	Number of adverse events (AEs)				Number of participants with at least 1 AE				Number of 'Possibly-Related' AEs				Number of participants with at least 1 'Possibly-Related' AEs			
	R0033 (n=48)	R0052 (n=50)	R0071 (n=49)	Placebo (n=51)	R0033 (n=48)	R0052 (n=50)	R0071 (n=49)	Placebo (n=51)	R0033 (n=48)	R0052 (n=50)	R0071 (n=49)	Placebo (n=51)	R0033 (n=48)	R0052 (n=50)	R0071 (n=49)	Placebo (n=51)
Gastrointestinal disorder	24	16	15	13	19	14	13	13	3	3	1	1	3	3	1	1
Infections and infestations	2	2	6	5	2	2	6	3	0	0	0	0	0	0	0	0
Bone and joint injuries	0	4	1	4	0	4	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Nervous system disorders	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiratory, thoracic and mediastinal disorders	19	14	10	9	13	9	7	7	0	1	0	0	0	1	0	0
Skin and subcutaneous tissue disorders	0	2	0	2	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Eye disorders	4	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Ear and labyrinth disorders	3	3	3	1	3	2	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fever (LLT)	7	7	2	5	6	5	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	57 <sup>b</sup>	50 <sup>b</sup>	39 <sup>b</sup>	42	45 <sup>b</sup>	40 <sup>b</sup>	34 <sup>b</sup>	38	3	4	1	1	3	4	1	1

<sup>a</sup> R0033 = *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* R0033, R0052 = *Lactobacillus helveticus* R0052, R0071 = *Bifidobacterium bifidum* R0071; LLT = low level term.

<sup>b</sup> Significant equivalence with a 95% confidence level ( $P < 0.05$ ).

**Table 4. Absolute and relative frequencies of affirmative (yes) answers to the questions asked at the weekly phone calls and visits 3 and 4.<sup>1</sup>**

	Absolute frequencies (relative frequencies)			
	<i>Bifidobacterium infantis</i> R0033 (n=459)	<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 (n=450)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> R0071 (n=441)	Placebo (n=468)
Fever	14 (0.032)	20 (0.044)	13 (0.029)	12 (0.027)
Rash	5 (0.012)	6 (0.013)	5 (0.011)	3 (0.007)
Diarrhoea	22 (0.051)	13 (0.029)	13 (0.029)	14 (0.032)
Unscheduled visit to doctor	32 (0.074)	31 (0.069)	21 (0.048)	25 (0.057)
Change in sleeping habits	47 (0.109)	61 (0.036)	41 (0.088)	39 (0.088)
Crying	53 (0.123)	80 (0.178)	67 (0.143)	59 (0.134)

<sup>1</sup> Questions asked at the weekly phone calls and at visit 3 and 4: Fever: Did your infant suffer a fever episode in the last week?; Rash: Did your infant have a rash on any part of his/her body in the last week?; Diarrhoea: Did your infant have diarrhoea in the last week?; Unscheduled visit to doctor: Did your infant have an unscheduled visit to the doctor last week? If yes, why?; Change in sleeping habits: Were there any changes in your infant's sleeping habits?; Crying: Did your infant cry excessively in the last week?

the consumption of probiotics did not affect growth (Lee *et al.*, 2015).

Adverse events, concentration of D-lactic acid in urine samples and tolerance parameters such as characteristics

of the stools were evaluated in this study. The AEs were classified according to the MedDRA SOC classification (Räihä *et al.*, 2002). None of the participants suffered a SAE during the study and the number of AEs recorded during the entire duration of the study was under the

S. Manzano et al.

**Table 5. Average of affirmative (yes) answers to questionnaires per week recorded for stools' characteristics (number, quantity, consistency and colour) and equivalence test.<sup>1</sup>**

		<i>Bifidobacterium infantis</i> R0033 Median (IQR)	<i>Lactobacillus helveticus</i> R0052 Median (IQR)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> R0071 Median (IQR)	Placebo Median (IQR)
Week 3	N stools <sup>2</sup>	2.00 (1.28-2.43) <sup>a</sup>	2.00 (1.57-2.57) <sup>a</sup>	1.86 (1.43-2.57) <sup>a</sup>	1.71 (1.14-2.86)
	Quantity <sup>3</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3)
	Consistency <sup>4</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3)
	Ordered coded colour <sup>5</sup>	2 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	2 (1-2) <sup>a</sup>	2 (1-2)
Week 4	N stools	1.71 (1.28-2.43) <sup>a</sup>	2.00 (1.32-2.71) <sup>a</sup>	1.57 (1.14-2.36) <sup>a</sup>	1.71 (1.14-2.75)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	2 (1-2) <sup>a</sup>	2 (1-2)
Week 5	N stools	1.86 (1.28-2.57) <sup>a</sup>	2.00 (1.18-2.53) <sup>a</sup>	1.86 (1.07-2.57) <sup>a</sup>	1.77 (1.25-2.75)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-4) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2)
Week 6	N stools	1.85 (1.28-2.36) <sup>a</sup>	2.21 (1.28-2.57) <sup>a</sup>	1.85 (1.14-2.43) <sup>a</sup>	1.78 (1.14-2.46)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2)
Week 7	N stools	1.71 (1.21-2.43) <sup>a</sup>	2.07 (1.28-2.57) <sup>a</sup>	1.71 (1.28-2.07) <sup>a</sup>	1.71 (1.26-2.61)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (2-25-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-25-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2)
Week 8	N stools	1.86 (1.21-2.50) <sup>a</sup>	2.00 (1.17-2.53) <sup>a</sup>	1.71 (1.14-2.14) <sup>a</sup>	1.78 (1.14-2.71)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-4) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (2-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2)
Week 9	N stools	1.87 (1.21-2.36) <sup>a</sup>	1.86 (1.28-2.57) <sup>a</sup>	1.71 (1.00-2.17) <sup>a</sup>	2.00 (1.25-2.43)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (2-75-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2)
Week 10	N stools	1.86 (1.28-2.43) <sup>a</sup>	2.00 (1.28-2.57) <sup>a</sup>	1.71 (1.14-2.15) <sup>a</sup>	1.93 (1.28-2.57)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (2-5-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (2-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2)
Week 11	N stools	1.86 (1.14-2.28) <sup>a</sup>	1.93 (1.41-2.43) <sup>a</sup>	1.71 (1.21-2.15) <sup>a</sup>	1.86 (1.28-2.43)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (2-25-3) <sup>a</sup>	3 (2-50-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2)
Week 12	N stools	1.84 (1.15-2.32) <sup>a</sup>	1.86 (1.30-2.43) <sup>a</sup>	1.67 (1.17-2.36) <sup>a</sup>	1.86 (1.15-2.71)
	Quantity	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Consistency	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3) <sup>a</sup>	3 (3-3)
	Ordered coded colour	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2) <sup>a</sup>	1 (1-2)

<sup>1</sup> Values with a superscript letter have a significant equivalence with a 95% confidence level ( $P < 0.05$ ) when compared with the placebo group using a non-parametric test. The statistically significant difference was established at 1.

<sup>2</sup> N Stools: the average number of stools per week (mean) was calculated and rounded to an integer.

<sup>3</sup> Quantity: the most frequent quantity of stools per week (mode) is shown with a range of: 1 – Smeat; 2 – less than 25%; 3 – between 25 and 50%; 4 – more than 50%.

<sup>4</sup> Consistency: the most frequent consistency of stools per week (mode) is shown with a range of: 1 – watery; 2 – soft; 3 – formed; 4 – hard.

<sup>5</sup> Ordered colour: first, the most frequent colour of stools per week (mode) with a range of I, II, III, IV, V and VI was taken into account. Then, this outcome was ordered according to the total proportions observed for each one of the categories, following the same criteria (high to low proportions) as described by Bekkali et al. (2009).

minimum relevant difference of 10%. The total number of AEs recorded was equivalent between the 4 groups and, therefore, they could not be attributed to the study product administered to the infants. These results are in accordance with those observed in other studies, further supporting the safety of certain lactobacilli and bifidobacteria strains and promoting their use as probiotics (Allen *et al.*, 2010; Chouraqui *et al.*, 2008; Dekker *et al.*, 2009; Weizman and Alsheikh, 2006).

To date no case of D-lactic acidosis because of intake of D-lactate-producing *Lactobacillus* has been documented in healthy infants. Reviewing the literature, all of the D-lactic acidosis cases were identified in infants with short bowel syndrome. Conversely, it has been shown that administration of a D-lactate-producing *Lactobacillus* species to children with short bowel syndrome, leads to a faster remission of the symptomatology than with probiotic strains that produce only L-lactate (Connolly and Lönnerdal, 2004). In this work, the levels of D-lactate in the urine samples analysed were below the quantification limit of the method, 33 µM or 3.6 – 105 mmol/mol of creatinine, considering reference ranges of creatinine in infants less than 2 years of life (<http://tinyurl.com/7el5m6r>, 2015). The urinary D-lactate concentrations reported previously in healthy infants after consumption of different probiotic strains indicated variability in D-lactate concentration that was unlikely to be attributed to *Lactobacillus* intake (Haschke-Becher *et al.* 2000, 2008; Papagaroufalos *et al.*, 2014). This fact highlights the lack of relation between the intake of these strains and D-lactate amounts in urine.

Finally, stool characteristics may help in the assessment of tolerance of a probiotic (Saavedra *et al.*, 2004). In this study, stool characteristics were evaluated weekly and compared with the placebo group. All of the three probiotic strains were found equivalent to the placebo showing that the consumption of these probiotic strains was well tolerated by infants aged between 3 to 12 months. In conclusion, the use of *B. longum* subsp. *infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 and *B. bifidum* R0071 in infancy is safe and well tolerated.

### Conflict of interest

This work was supported by Lallemand Health Solutions Inc. (Montreal, Canada). The authors declared no conflict of interest.

### Acknowledgements

We acknowledge all the families that participated in this study. We also acknowledge paediatricians Felix Omeñaca, Susana Ares, Luis Vázquez, Maria Teresa González, Gracia Tamayo, Esther Cantera for their assessment and collaboration.

### References

- Allen, S.J., Jordan, S., Storey, M., Thornton, C.A., Gravenor, M., Garaiova, I., Plummer, S.F., Wang, D. and Morgan, G., 2010. Dietary supplementation with lactobacilli and bifidobacteria is well tolerated and not associated with adverse events during late pregnancy and early infancy. *Journal of Nutrition* 140: 483-488.
- Bekkali, N., Hamers, S.L., Retisma, J.B., Van Toledo, L. and Benninga, M.A., 2009. Infant stool form scale: development and results. *Journal of Pediatrics* 154: 521-526.
- Bertelli, C., Pillonel, T., Torregrossa, A., Prod'homme, G., Fischer, C.J., Greub, G. and Giannoni, E., 2015. *Bifidobacterium longum* bacteremia in preterm infants receiving probiotics. *Clinical Infectious Diseases* 60(6): 924-927.
- Braegger, C., Chmielewska, A., Decsi, T., Kolacek, S., Mihatsch, W., Moreno, L., Pieścik, M., Puntis, J., Shamir, R., Szajewska, H., Turck, D. and Van Goudoever, J., 2011. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 52: 238-250.
- Cazzola, M., Tompkins, T.A. and Matera, M.G., 2010a. Immunomodulatory impact of a synbiotic in T(h)1 and T(h)2 models of infection. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 4: 259-270.
- Cazzola, M., Pham-Thi, N., Kerihuel, J.C., Durand, H. and Bohbot, S., 2010b. Efficacy of a synbiotic supplementation in the prevention of common winter diseases in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* 4: 271-278.
- Chouraqui, J.P., Grathwohl, D., Labaune, J.M., Hascoet, J.M., Montgolfier, I., Leclaire, M., Giarre, M. and Steenhout, P., 2008. Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 87: 1365-1373.
- Chouraqui, J.P., Van Egroo, L.D. and Fichot, M.C., 2004. Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 38: 288-292.
- Connolly, E. and Lönnerdal, B., 2004. D(-)-lactic acid-producing bacteria. Safe to use in infant formulas. *Nutrafoods* 3(3): 37-49.
- Da Silva, G.T., Logan, B.R. and Klein, J.P., 2008. Methods for equivalence and noninferiority testing. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 15, Suppl. 1: 120-127.
- Dani, C., Coviello, C.C., Corsini, I.I., Arena, F., Antonelli, A. and Rossolini, G.M., 2016. *Lactobacillus Sepsis* and probiotic therapy in newborns: two new cases and literature review. *AJP Reports* 6: e25-e29.
- Dekker, J.W., Wickens, K., Black, P.N., Stanley, T.V., Mitchell, E.A., Fitzharris, P., Tannock, G.W., Purdie, G. and Crane, J., 2009. Safety aspects of probiotic bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 in human infants aged 0-2 years. *International Dairy Journal* 19: 149-154.



S. Manzano et al.

- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO), 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Available at: <http://tinyurl.com/ou88oa2>.
- Food and Drug Administration (FDA), 2016. Department of Health and Human Services. Code of Federal Regulations, Title 21, Vol. 5. Available at: <http://tinyurl.com/hxdjzaa>.
- Frick, J.S., Schenk, K., Quitadamo, M., Kahl, F., Köberle, M., Bohn, E., Aepfelbacher, M. and Autenrieth, I.B., 2007. *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. *Inflammatory Bowel Diseases* 13: 83-90.
- Gourbeyre, P., Denery, S. and Bodinier, M., 2011. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology* 89: 685-695.
- Haschke-Becher, E., Baumgartner, M. and Bachmann, C., 2000. Assay of d-lactate in urine of infants and children with reference values taking into account data below detection limit. *Clinica Chimica Acta* 298: 99-109.
- Haschke-Becher, E., Brunser, O., Cruchet, S., Gotteland, M., Haschke, F. and Bachmann, C., 2008. Urinary d-lactate excretion in infants receiving *Lactobacillus johnsonii* with formula. *Annals of Nutrition and Metabolism* 53: 240-244.
- Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. and Isolauri, E., 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo controlled trial. *Lancet* 357: 1076-1079.
- Koletzko, B., Von Kries, R., Closa, R., Escribano, J., Scaglioni, S., Giovannini, M., Beyer, J., Demmelmair, H., Gruszfeld, D., Dobrzanska, A., Sengier, A., Langhendries, J.P., Rolland Cachera, M.F. and Grote, V., 2009. Lower protein in infant formula is associated with lower weight up to age two years: a randomized clinical trial. *American Journal of Clinical Nutrition* 89: 1836-1845.
- Lee, L.Y., Bharani, R., Biswas, A., Lee, J., Tran, L.A., Pecquet, S. and Steenhout, P., 2015. Normal growth of infants receiving an infant formula containing *Lactobacillus reuteri*, galacto-oligosaccharides, and fructo-oligosaccharide: a randomized controlled trial. *Maternal Health, Neonatology and Perinatology* 1: 9.
- Macpherson, A.J. and Harris, N.L., 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews. Immunology* 4: 478-485.
- Mascha, E.J. and Sessler, D.J., 2011. Equivalence and noninferiority testing in regression models and repeated-measures designs. *Anesthesia and Analgesia* 12: 678-687.
- Mei, L.X. and Chen, Z., 2008. Evaluation of the efficacy of a synbiotic preparation on rotaviral infection in children. *Medical Information* 21: 893-895.
- Papagaroufalos, K., Fotiou, A., Egli, D., Tran, L.A. and Steenhout, P., 2014. A randomized double blind controlled safety trial evaluating D-lactic acid production in healthy infants fed a *Lactobacillus reuteri*-containing formula. *Nutrition and Metabolic Insights* 22: 19-27.
- Plaza-Díaz, J., Gómez-Llorente, C., Campaña-Martin, L., Matencio, E., Ortuño, I., Martínez-Silla, R., Gomez-Gallego, C., Periago, M.J., Ros, G., Chenoll, E., Genovés, S., Casinos, B., Silva, A., Corella, D., Portolés, O., Romero, F., Ramón, D., Perez de la Cruz, A., Gil, A. and Fontana, L., 2013. Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB Study. *PLoS ONE* 8: e78111.
- Räihä, N.C., Fazzolari-Nesci, A., Cajozzo, C., Puccio, G., Monestier, A., Moro, G., Minoli, I., Haschke-Becher, E., Bachmann, C., Van't Hof, M., Carrié Fässler, A.L. and Haschke, F., 2002. Whey predominant, whey modified infant formula with protein/energy ratio of 1.8 g/100 kcal: adequate and safe for term infants from birth to four months. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 35: 275-281.
- Rautava, S., Salminen, S. and Isolauri, E., 2009. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy – a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition* 101: 1722-1726.
- Saavedra, J.M., Abi-Hanna, A., Moore, N. and Yolken, R.H., 2004. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *American Journal of Clinical Nutrition* 79(2): 261-267.
- Szajewska, H. and Chmielewska, A., 2013. Growth of infants fed formula supplemented with *Bifidobacterium lactis* Bb12 or *Lactobacillus* GG: a systematic review of randomized controlled trials. *BMC Pediatrics* 13: 1-10.
- Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J.C., Armanska, M. and Mikolajczyk, W., 2001. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *Journal of Pediatrics* 138: 361-365.
- Thompson, C., McCarter, Y.S., Krause, P.J. and Herson, V.C., 2001. *Lactobacillus acidophilus* sepsis in a neonate. *Journal of Perinatology* 21: 258-260.
- Van Niel, C.W., 2005. Probiotics: not just for treatment anymore. *Pediatrics* 115: 174-177.
- Weizman, Z. and Alsheikh, A., 2006. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition* 25: 415-419.
- Wind, R.D., Tolboom, H., Klare, I., Huys, G. and Knol, J., 2010. Tolerance and safety of the potentially probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* PRSFL477: a randomised, double-blind placebo-controlled trial in healthy volunteers. *British Journal of Nutrition* 104: 1806-1816.
- Wine, E., Gareau, M.G., Johnson-Henry, K. and Sherman, P.M., 2009. Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters* 300: 146-152.

IV.7. A placebo-controlled, double-blind, randomized study to investigate the effect of three probiotic strains on infants' gut microbial and immunological composition

de Andrés J, Manzano S, García C, Rodríguez JM, Espinosa-Martos I, Jiménez E.

Enviado a *Beneficial Microbes* en 18 de septiembre de 2017.



# A placebo-controlled, double-blind, randomized study to investigate the effect of three probiotic strains on infants' gut microbial and immunological composition.

De Andrés J<sup>\*1</sup>, Manzano S<sup>\*1,2</sup>, García C<sup>2</sup>, Rodríguez JM<sup>1</sup>, Espinosa-Martos I<sup>2</sup>, Jiménez E<sup>1,2†</sup>.

Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid, Av. Puerta de hierro s/n, 28040, Madrid, Spain. Probisearch S.L.U., C/ Santiago Grisolia, 2, 28760, Tres Cantos, Spain.

\* JdA and SM. These authors contributed equally to this work.

†Correspondence: Dr. Esther Jiménez, Probisearch, C/ Santiago Grisolia, 2, 28760 Tres Cantos, Spain. Phone: +34 918 035 179. E-mail: [esther.jimenez@probisearch.com](mailto:esther.jimenez@probisearch.com)

## Abstract

## RESEARCH ARTICLE

The gut microbiota plays a crucial role in gastrointestinal health. Current use of probiotics is aimed at modulating the bacterial gut composition in order to alleviate specific diseases. The safety and tolerance of three probiotic strains (*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* R0033, *Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium bifidum* R0071) has recently been described. The objective of the present study was to analyze the microbiological and immunological composition of faecal samples obtained from healthy infants after receiving either one of the three probiotic strains or placebo for 8 weeks. 16S ribosomal RNA gene sequencing and multiplexing technology was used for analysis. Faecal sample analysis showed that the most abundant genus in all four groups of infants pre- and post- intervention was *Bifidobacterium*, representing approximately 50% of the sequences. After the intervention period of 8 weeks the microbial composition of faecal samples from infants in the probiotic groups did not display notable changes. In contrast, a decrease in *Bifidobacterium* species and an increase in *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus* and *Faecalibacterium* genera was observed in the placebo group. The analysis of a wide range of immune factors in faecal samples suggests a modulatory effect by these three probiotic strains during the intervention period. The anti-inflammatory ratio IL10/IL12 increased at the end of the intervention period in the *B. infantis* R0033 group. The decrease of the IL10/IL12 ratio together with the increase of the TNF $\alpha$ /IL10 ratio demonstrated a pro-inflammatory profile in the placebo group. In conclusion, the species profile of the microbiome observed in all three probiotic groups resembled that of a younger infant when compared to the placebo group which may also be related with an anti-inflammatory effect.

**Keywords:** clinical trial, healthy infants, probiotics, 16S rRNA, immune system

### 1. Introduction

The microbial composition of the gastrointestinal tract is closely related to an infant's health (Matamoros et al.,

2013). During the first year of life, the microbial gut composition increases in diversity and slowly develops towards the microbiota profile of adults (Francino et al, 2014). These changes

are influenced by medical, cultural, and environmental factors including mode of delivery and diet.

Probiotics are live microorganisms that confer diverse health benefits, related to supporting a healthier digestive tract and immune system. Recently there has been an increase in the use of probiotics with the intention of improving infant health and thus probiotics are entering the therapeutic mainstream of pediatric health (Van Niel 2005). The species with beneficial properties most frequently commercialized belong to the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. The biological effects of probiotics are strain specific and consequently, failure or success cannot be extrapolated from one strain to another (Rijkers et al., 2011). Despite this potential for variable outcomes, lactic acid bacteria and bifidobacteria have a long record of safe use (FAO/WHO 2002). Therefore, well-designed clinical trials should be conducted to investigate the safety, microbiological and immunological effects of specific probiotic strains, especially in pediatric populations.

Over the last few years, a close relationship between the gut microbiota development and immune system maturation has been established (Zeissig et al., 2014). However, at present, little is known about the direct effect of bacterial colonization on the maturation of the immune system in infants (Hatakka et al., 2001; Johansson et al., 2012; Maynard et al., 2012). Several studies have assessed immune compounds in saliva, umbilical cord blood, or peripheral blood of infants (Wan et al., 2003; Matoba et al., 2009; Sjogren et al., 2009). However, only a few studies have investigated a wide range of immunological compounds in infant faecal samples including: cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins (Prokesová et al. 2006). Studies which have assessed changes in the infant gut microbiota and faecal immune compounds after the intake of prebiotics (Sholtens et al., 2008; Sierra et al., 2015) and probiotics

(Gil-Campos et al., 2012; Holscher et al., 2012; Olivares et al., 2014) were restricted to culture-based enumeration methods; qPCR or ELISA. These techniques, although sufficient, provide limited information and are time consuming.

Recently, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial was performed to assess the safety and tolerance of three different probiotic strains (*Lactobacillus helveticus* R0052, *Bifidobacterium bifidum* R0071, and *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* R0033) in healthy infants within the first 3 to 12 months of life (Manzano et al., 2017). Secondary outcomes from the study were assessed using faecal samples from a subgroup of infants, before and after eight weeks of intervention. Bacterial composition was determined with 16S rDNA gene sequencing and concentrations of a wide range of immune compounds were obtained with multiplex technology.

## 2. Material and Methods

### *Bacterial strains*

This work is related to a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-centre intervention study performed in the region of Madrid with 221 infants, to assess the safety and tolerance of three probiotic strains (*L. helveticus* R0052, *B. bifidum* R0071, and *B. infantis* R0033).

Three probiotic strains were supplied as fine white powder packed in sealed sachets containing  $3 \times 10^9$  CFU of *B. infantis* R0033 or *L. helveticus* R0052 or *B. bifidum* R0071 (freeze-dried) and potato starch as an excipient (provided by Lallemand Health Solutions, Mirabel, Canada). The placebo contained only the excipient, having the same appearance and color as the probiotic. Sachets were diluted in 10 mL of water, breast milk or formula milk prior to administration.

### *Study design*

Infants from 3 to 12 months of age, breastfed and/or formula fed, were recruited and randomized into one of the three probiotic groups or the placebo group. The study was divided into 3 parts; a 2-week run-in period, 8-week probiotic or placebo intervention period, followed by a 2-week follow-up period. Parents were asked not to give any other probiotic product during the study. A list of infant formulas, which did not contain probiotics and were available on the market, was given to the parents. Informed consent was obtained from one or both parents before inclusion. Ethics committee approval was obtained from Hospital Universitario La Paz (reference 4176). This study was registered on clinicaltrials.gov (NCT02215304). Clinical follow-up was done weekly during the intervention period and at the end of the follow-up period. Parents completed a questionnaire during these 10 weeks. In all, 202 infants completed the study. A subgroup of 92 participants (23 participants in each group) was used in order to characterize the bacterial and immunological composition of faecal samples before and after intervention. Results from this analysis are presented in this paper. The probiotic groups and placebo group did not differ with respect to potential confounders such as type of birth, sex, age, feeding type, ethnicity, height, weight and head circumference (Manzano et al., 2017).

#### *Samples*

Faecal samples from the participants were collected from the diapers of the infants at the beginning of the study (T0), after 2 weeks of run-in period (T1), after 8 weeks of intervention (T2) and after two weeks of the follow-up period (T3). Faecal samples were immediately frozen and stored at -20°C.

#### *Composition of faecal microbiota*

In order to characterize the bacterial composition of faecal samples (T1) and to detect possible changes after the intervention period (T2), sequencing with Illumina technology was performed

on the 92 participants subgroup (23 participants in each group). High quantity and quality of DNA was extracted from faecal samples collected before and after the intervention period (T1 and T2) using the IHMS\_SOP 06 protocol (Dore et al., 2015).

The bacterial 16S rRNA gene was amplified using primers that flanked the variable region V3 and V4. Amplicons were produced by two consecutive rounds of PCR. The first round of PCR amplified the targeted V3–V4 region, while the second round of PCR attached the sample barcode and sequencing adapters. The PCR primer sequences were V3V4 - CS1 (ACACTGACGACA TGGTTCTACACCTACGGGNGGCW GCAG) and V3V4 - CS2 (TACGGTAG CAGAGACTTGGTCTGACTACHVG GGTATCTAATCC). All primers were synthesized by Isogen Life Sciences (Castelldefels, Spain).

Barcoded PCR products from all samples were pooled at approximately equal molar DNA concentrations and run on a preparative agarose gel. The correct sized band was excised and purified using a QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and quantified with PicoGreen (BMG Labtech, Jena, Germany). The 16S rDNA amplicons were sequenced on an Illumina MiSeq technology (Illumina Inc., San Diego, CA, USA).

#### *Sequence analysis and taxonomic classification*

Raw sequences were processed according to their quality using the program TRIMOMATIC by filtering reads that showed a window of 50 base pairs with an average of quality values below 25. MOTHUR v 1.33.0 and UCHIME programs were used to eliminate chimeras and ambiguous bases. Resulting reads of quality controls were assembled and classified taxonomically by comparison with databases Greengenes, Ribosomal Database Project and SILVA using a



Bayesian classification method and a level of similarity of at least 97%.

#### *Immunological analysis*

Prior to the analysis, faeces were thawed and aliquots taken for both the calprotectin and immunological multiplexing analysis. The faecal water content was extracted from at least 1 g of feces by centrifugation (14,000 x g, 2 h, 4 °C) and aliquots of 100 µL were stored for less than a year at -20°C until multiplexing analysis. Then, the concentrations of 18 cytokines, chemokines, and growth factors were determined using the Human Cytokine group I and II assay kits (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) in a Bioplex 200 system instrument (Bio-Rad). These include: interleukins (IL) 1β, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12(p70), 13, and 17, interferon-gamma (IFN-γ), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), growth regulated oncogene-alpha (Gro-α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1β (MIP-1β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α). The concentrations of immunoglobulin (Ig) G1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA were assessed using the Bio-Plex Pro™ Human Isotyping Assays (Bio-Rad) with the Bioplex 200 system instrument (Bio-Rad). All analyses were carried out in duplicate following the manufacturer's instructions. Calibration curves for each analyte were constructed using triplicate values for each known concentration and the Bio-Plex Manager 6.0 software (Bio-Rad). The inter-assay coefficients of variation were below manufacturers' instructions for all the immune markers.

Additionally, calprotectin levels (LLOQ: 8 ng/L of extract) were determined in the faeces using the commercially available Calpro EasyExtract™ extraction devices and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Calpro, Lysaker, Norway) according to the extraction and analysis

instructions of the manufacturer. The standard curve of calprotectin was obtained from duplicates of each assayed concentration and fit to a 4-parameter curve model.

#### *Statistical analysis*

Quantitative data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean. When not normally distributed, the data was presented as the median and interquartile range (IQR). The richness and diversity of the faecal microbiota were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. The  $\chi^2$  test was used to find differences in the detection frequencies of the immune compounds. Paired t-test or Wilcoxon signed rank test were used to compare microbiological data and levels of immune compounds within groups before and after treatment periods. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used to compare differences in microbiological and immune compound data at different sampling times and to evaluate the changes observed between the four study groups.

Linear models were used to evaluate the effect of type of feeding, age, and treatment on the faecal microbiota. The age of the infants was calculated in days and equally divided and categorized into three levels:  $\leq 152$  days (1),  $152 \text{ days} < (2) \leq 250$  days and  $> 250$  days (3). Subsequently, linear models for the principal genera detected in faecal samples at T1 and T2 were obtained, including also the treatment group. Thus, "Genera = Group of age + Product+ Feeding type" was the linear model formula used with a default group of age =3; intervention group = placebo and feeding type = formula. An ANOVA test of each of the models was also performed to statistically assess the effect and/or relationship of each factor.

The immune compounds and the bacterial genera detected in faecal

samples were further analyzed by applying exploratory multivariate analyses, such as principal component analysis (PCA) and multiple factorial analysis (MFA). Differences were

reads revealed that Actinobacteria (50.21 %  $\pm$  19.39 %) was the most abundant phylum in all faecal samples followed by Firmicutes (36.27 %  $\pm$  16.09 %) (Table1). Faecal samples from the *L. helveticus* R0052 group showed

Phylum	<i>B. infantis</i> R0033		<i>pa</i>	<i>L. helveticus</i> R0052		<i>pa</i>
	T1	T2		T1	T2	
<i>Actinobacteria</i> *	50.75 (43.54-57.96)	50.81 (43.38-58.25)	0.988	45.86 (36.22-55.50)	47.47 (37.31-57.64)	0.591
<i>Firmicutes</i> *	33.74 (28.24-39.25)	31.76 (26.37-37.15)	0.535	46.02 (36.30-55.74)	35.37 (28.08-42.65)	0.011
<i>Proteobacteria</i>	8.97 (2.39-18.81)	13.99 (4.44-19.79)	0.323	3.76 (1.99-7.38)	10.70 (5.46-13.47)	0.006
<i>Bacteroidetes</i>	0.33 (0.06-1.86)	0.37 (0.04-3.32)	0.403	0.23 (0.07-0.79)	0.15 (0.06-0.78)	0.513
<i>Thermi</i>	0.07 (0.06-0.08)	0.07 (0.06-0.08)	0.688	0.07 (0.06-0.08)	0.07 (0.06-0.08)	0.656
Other	0.07 (0.06-0.10)	0.08 (0.05-0.11)	0.338	0.12 (0.07-0.27)	0.10 (0.07-0.14)	0.456

Phylum	<i>B. bifidum</i> R0071		<i>pa</i>	Placebo		<i>pa</i>
	T1	T2		T1	T2	
<i>Actinobacteria</i> *	56.36 (48.63-64.09)	55.78 (49.28-62.29)	0.877	51.21 (42.69-59.72)	43.20 (34.19-52.20)	0.130
<i>Firmicutes</i> *	31.64 (26.06-37.21)	35.68 (29.43-41.93)	0.084	37.35 (30.55-44.15)	38.82 (31.64-46.00)	0.669
<i>Proteobacteria</i>	7.24 (2.87-9.60)	7.60 (5.77-9.42)	0.637	3.15 (2.05-15.01)	10.17 (3.34-20.55)	0.086
<i>Bacteroidetes</i>	0.13 (0.03-1.30)	0.15 (0.04-0.52)	0.749	0.05 (0.04-0.31)	0.34 (0.05-2.13)	0.000
<i>Thermi</i>	0.08 (0.07-0.09)	0.07 (0.06-0.08)	0.046	0.07 (0.06-0.08)	0.06 (0.05-0.07)	0.259
others	0.16 (0.10-0.22)	0.17 (0.11-0.23)	0.333	0.08 (0.05-0.12)	0.13 (0.08-0.26)	0.002

**Table 1. Analysis of the main phyla detected in faecal samples at the beginning (T1) and end (T2) of the intervention period.**

considered significant at  $P < 0.05$ . Statgraphics Centurion XVII version 17.0.16 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 3.0.3 (R project, Statistical Software) software with “FactoMineR” package were used to carry out the analysis cited above.

### 3. Results

#### *Sequencing data and microbial diversity*

The bacterial composition of faecal samples from 92 infants (23 per treatment group) was assessed using 16S rDNA gene sequencing before and after the product intake. A mean of 72,541 ( $\pm$ 7,529) reads was obtained for every sample and an average of 91.66% of the reads passed the quality filtering procedure. The reads were annotated based on sequence similarity to 16S rDNA genes extracted from the NCBI nt database. Taxonomic assignment of the

an elevated proportion of Firmicutes at baseline (before the intervention period) with respect to *B. infantis* R0033, *B. bifidum* R0071 or placebo ( $P=0.021$ ). Significant statistical differences were detected in the phyla Firmicutes and Proteobacteria in the *L. helveticus* R0052 group after the intervention period ( $P=0.011$  and  $P=0.006$ , respectively). Other significant changes observed after the intervention period at a phylum level were the number of reads assigned to the Thermi phylum that decreased in the *B. bifidum* R0071 group ( $P=0.046$ ), while Bacteroidetes increased in the placebo group ( $P<0.001$ ).

At the genus level, *Bifidobacterium* was the most abundant genus detected both at the beginning and at the end of the intervention period in all the four groups ranging from 43.76% to 58.11% of the total reads (Table 2) (Figures S1, S2, S3 and S4). *Streptococcus* was the second most abundant genus in all groups (except for the *L. helveticus* R0052 group) ranging from 3.08% to 13.78%

(Table 2) (Figures S1, S2, S3 and S4). However, there were no statistically significant differences in the *Bifidobacterium* and *Streptococcus* levels before and after the intervention period in any of the four groups.

In contrast, some intervention-dependent differences were detected in the other less abundant bacterial genera (except for *Erysipelothrix*, *Eubacterium* and *Veionella*) (Table 2). In faecal samples from infants that received *B. infantis* R0033, a significant reduction in *Collinsella*, *Enterococcus* and *Klebsiella* genera was detected at the end of the intervention period ( $P=0.006$ ,  $P=0.032$  and  $P=0.009$ , respectively) while *Alkaliphilus* increased significantly ( $P=0.001$ ) (Table 2) (Figure S1).

Significant differences were observed in six genera in infant faecal samples from the *L. helveticus* R0052 intervention group (Table 2) (Figure S2). Among them, *Enterococcus*, *Klebsiella* and *Slakia* decreased ( $P=0.018$ ,  $P=0.037$  and  $P=0.012$ , respectively) while *Enterobacter*, *Escherichia* and *Serratia* increased ( $P=0.002$ ,  $P=0.037$  and  $P=0.004$  respectively). A notable increase in the average abundance of *Lactobacillus* (from a median initial value of 0.09 to a final value of 0.36) was detected in the faecal samples from infants in this group (Table 2) (Figure S2).

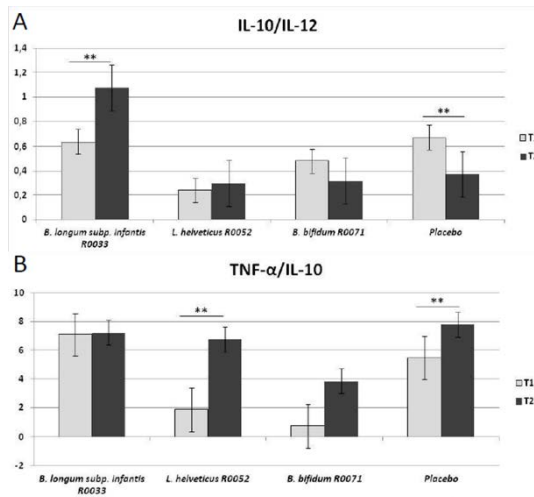
Fecal samples from infants that received *B. bifidum* R0071 showed significant differences in five genera. A decrease of *Enterococcus* and *Lactobacillus* ( $P=0.007$  and  $P=0.001$  respectively) and an increase in *Faecalibacterium*, *Klebsiella* and *Ruminococcus* ( $P=0.018$ ,  $P=0.037$  and  $P=0.030$ , respectively) (Table 2) (Figure S3). Faecal samples from the infants that received placebo showed a significant increase in five genera; *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Coproccoccus*, *Faecalibacterium* ( $P=0.001$ ,  $P=0.009$ ,  $P=0.043$ ,  $P=0.034$ ,  $P=0.002$ , respectively). Whereas a significant

decrease in the *Enterococcus* ( $P=0.014$ ) genus was detected (Table 2) (Figure S4).

Bacterial communities at the species level displayed a wide variety of profiles and followed individual specific patterns (Table S1, Figures S5, S6, S7 and S8). The dominant bacterial species was *B. longum* having similar average concentrations (ranging from 7.31 to 13.61%) in all four intervention groups (Table S1). When comparing the changes registered in the species profile between the groups, the majority of the *Bifidobacterium* species decreased in the placebo group after the intervention period, while in the probiotic groups the bifidobacterial levels showed very small changes. However, no statistical differences were observed in Shannon diversity index between groups before the run-in period (T1) and after the intervention (T2) period, except for infants from the *B. bifidum* R0071 group where a significant increase with a confidence level of 90% ( $P=0.091$ ) was observed. (Table S1).

In all four groups, some infants had different bacterial profiles characterized by low levels of the *Bifidobacterium* species. Their *Bifidobacterium* concentrations were below the 25% interquartile range (IQR) and this was the case in five infants in the *B. infantis* R0033 group at T1 (44.58%) and T2 (44.58%) (Figure S1), six infants in the *L. helveticus* R0052 group at T1 (36.81%) and T2 (37.85%) (Figure S2), two infants at T1 (42.5%) and one at T2 (34.37%) in the *B. bifidum* R0071 group (Figure S3) and seven infants in the placebo group at T1 (46.49%) and fifteen at T2 (50.20%) (Figure S4).

Linear models were used to evaluate the effect of type of feeding and age on the genera composition of faecal samples and the potential effect of the type of intervention (Table S2). The intervention group influenced *Coproccoccus*, *Eubacterium* and *Veionella*



**Figure 1: Changes in anti-inflammatory IL-10/IL-12 ratio (A) and pro-inflammatory TNF- $\alpha$ /IL-10 ratio (B) detected in faecal samples of infants after treatment period.**

levels ( $P=0.003$ ,  $P=0.025$  and  $P=0.041$ , respectively) and together with type of feeding (human milk) on *Alkaliphilus*, *Bifidobacterium*, *Blautia* and *Streptococcus* levels ( $P=0.012$ ,  $P=0.001$ ,  $P=0.049$  and  $P=0.048$ , respectively) in the infant faecal samples analyzed in this study after the intervention period (Table S2).

The *B. bifidum* R0071 group had an effect on seven genera (*Alkaliphilus*  $P=0.009$ , *Bifidobacterium*  $P=0.007$ , *Blautia*  $P=0.021$ , *Coprococcus*  $P=0.001$ , *Erysipelothrix*  $P=0.029$ , *Ruminococcus*  $P=0.007$  and *Streptococcus*  $P=0.047$ ). *B. infantis* R0033 also had an effect on seven genera including *Blautia*  $P=0.003$ , *Collinsella*  $P=0.052$ , *Coprococcus*  $P=0.001$ , *Erysipelothrix*  $P=0.022$ , *Eubacterium*  $P=0.006$ , *Streptococcus*  $P<0.000$  and *Veionella*  $P=0.033$ . The *L. helveticus* group showed an effect on only two genera (*Alkaliphilus*  $P=0.026$  and *Eubacterium*  $P=0.028$ ) (Table S2).

#### Immunological analysis

The concentrations of calprotectin, cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins were determined in faecal samples of 89 out of 92 infants (insufficient sample to perform analysis on three infants) collected before and after 8 weeks of intervention in the four study groups. Some immunological

compounds were detected in most of the samples including calprotectin, IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-10, G-CSF and IL-8 while the immunological compounds IL-13, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-7, GM-CSF, GRO- $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  were detected in a much lower number of samples (Table 3). There were no statistically significant differences between the detection frequency of each parameter among the four groups ( $\chi^2$  test, data not shown). The average amounts of calprotectin, cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins displayed wide inter-individual variability as shown by the high IQRs reported for some immune compounds (Table 3). For example, IL-17 ranged from 5.62 pg/g to 278.18 pg/g of faeces (baseline). There were no major changes in the immunological compounds during the intervention period in any of the groups (Table 3), with the exception of a R0033 group ( $P=0.036$ ) and in the placebo group the levels of TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-8 significantly increased during the intervention ( $P=0.022$ ,  $P=0.009$  and  $P=0.012$ , respectively). Furthermore, the significant increase in IFN- $\gamma$  in *B. infantis* and *B. bifidum* R0071, although significant, should be cautiously interpreted because this interleukin was only observed difference that is observed for IL-13 in the in a very low number of samples (8/89). Moreover, the change in INF- $\gamma$  and IL-4 was different among groups ( $P=0.008$  and  $P=0.042$ , respectively). Additionally, the ratios of IL-10/IL-12 and TNF $\alpha$ /IL-10 were calculated to evaluate the anti-inflammatory and pro-inflammatory status, respectively, in the colonic environment of the infants (Figure 1). The IL-10/IL-12 ratio increased following the administration of *B. infantis* R0033. However, in the placebo group, the ratio decreased with a simultaneous increase in the TNF $\alpha$ /IL-10 ratio (Figure 1). It should be noted that in the infants that ingested the *L. helveticus* R0052, the pro-inflammatory ratio increased significantly (Figure 1).

Table 2. Analysis of the most abundant detected genera in faecal samples at the beginning (T1) and the end (T2) of the intervention period.

Genus	<i>B. infantis</i> R0033			<i>L. helveticus</i> R0052			<i>B. bifidum</i> R0071			Placebo		
	T1	T2	P <sup>a</sup>	T1	T2	P <sup>a</sup>	T1	T2	P <sup>a</sup>	T1	T2	P <sup>a</sup>
<i>Alkaliphilus</i>	0.21 (0.02-0.32)	0.42 (0.03-0.82)	0.001	0.13 (0.07-0.39)	0.22 (0.13-0.75)	0.242	0.08 (0.02-0.26)	0.18 (0.06-0.35)	0.254	0.41 (0.03-0.91)	0.53 (0.17-1.51)	0.117
<i>Bacteroides</i>	0.28 (0.02-1.43)	0.11 (0.02-3.24)	0.513	0.16 (0.02-0.39)	0.12 (0.01-0.30)	0.749	0.03 (0.01-0.16)	0.06 (0.01-0.09)	0.915	0.02 (0.01-0.10)	0.19 (0.01-1.36)	0.001
<i>Bifidobacterium</i>	51.67 (44.41-58.92)	52.04 (44.58-59.50)	0.931	46.54 (36.81-56.28)	48.26 (37.85-58.67)	0.577	58.11 (46.49-69.37)	56.68 (50.20-63.16)	0.176	51.61 (42.53-60.69)	43.76 (34.37-53.16)	0.144
<i>Blautia</i>	2.22 (0.14-6.35)	1.34 (0.43-3.40)	0.230	4.97 (1.29-10.39)	7.59 (0.43-14.74)	0.338	3.28 (0.76-7.59)	4.27 (0.11-8.19)	0.796	2.49 (0.23-5.36)	8.08 (5.62-10.54)	0.009
<i>Clostridium</i>	0.38 (0.18-0.53)	0.33 (0.22-0.51)	0.796	0.36 (0.20-0.87)	0.40 (0.24-1.09)	0.939	0.99 (0.56-1.41)	1.16 (0.69-1.63)	0.132	0.57 (0.10-1.13)	0.93 (0.53-1.34)	0.043
<i>Collinsella</i>	0.03 (0.01-0.39)	0.01 (0.00-0.01)	0.006	0.40 (0.02-9.34)	0.19 (0.01-3.52)	0.057	0.02 (0.01-4.18)	0.07 (0.01-8.72)	0.370	0.12 (0.01-5.33)	1.83 (0.01-6.08)	0.915
<i>Coprococcus</i>	0.00 (0.00-0.01)	0.00 (0.00-0.38)	0.835	0.00 (0.00-0.01)	0.00 (0.00-0.93)	0.136	0.00 (0.00-0.02)	0.00 (0.00-0.38)	0.825	0.07 (0.00-0.53)	1.37 (0.00-1.73)	0.034
<i>Enterobacter</i>	0.45 (0.09-0.90)	0.44 (0.10-0.84)	0.456	0.11 (0.04-0.20)	0.37 (0.21-0.48)	0.002	0.30 (0.07-0.48)	0.31 (0.16-0.56)	0.369	0.11 (0.06-0.35)	0.44 (0.10-0.71)	0.057
<i>Enterococcus</i>	5.44 (3.14-7.79)	1.69 (0.81-4.04)	0.032	1.35 (0.25-15.20)	1.13 (0.11-3.80)	0.018	3.52 (1.31-6.83)	2.46 (0.53-4.11)	0.007	3.55 (1.58-14.10)	1.18 (0.34-2.53)	0.014
<i>Erysipelothrix</i>	0.21 (0.03-1.82)	0.50 (0.03-1.37)	0.616	2.51 (1.23-3.80)	0.62 (0.15-2.55)	0.704	0.11 (0.03-1.97)	0.57 (0.14-1.54)	0.773	0.80 (0.06-1.17)	1.03 (0.63-3.17)	0.207
<i>Escherichia</i>	4.82 (0.82-11.41)	8.02 (2.30-13.11)	0.280	1.49 (0.26-4.09)	5.74 (1.35-7.70)	0.006	3.63 (1.04-5.85)	3.47 (2.37-4.57)	0.704	0.97 (0.32-4.96)	5.78 (1.37-12.44)	0.070
<i>Eubacterium</i>	0.05 (0.01-0.27)	0.02 (0.00-0.04)	0.242	0.05 (0.00-1.19)	0.37 (0.21-0.48)	0.051	0.08 (0.00-0.49)	0.22 (0.00-1.73)	0.553	0.02 (0.01-0.39)	0.22 (0.00-1.86)	0.112
<i>Faecalibacterium</i>	0.04 (0.02-0.47)	0.04 (0.02-0.06)	0.176	0.06 (0.03-0.035)	0.03 (0.02-0.17)	0.796	0.03 (0.02-0.05)	0.06 (0.02-0.36)	0.018	0.03 (0.02-0.04)	0.04 (0.03-0.37)	0.002
<i>Klebsiella</i>	0.21 (0.02-0.64)	0.05 (0.02-0.07)	0.009	0.13 (0.02-0.41)	0.07 (0.02-0.13)	0.037	0.08 (0.02-0.17)	0.15 (0.02-0.30)	0.037	0.04 (0.03-0.16)	0.08 (0.03-0.17)	0.939
<i>Lactobacillus</i>	0.22 (0.05-1.06)	0.06 (0.03-0.71)	0.773	0.09 (0.04-0.24)	0.36 (0.14-1.16)	0.061	1.16 (0.14-2.68)	0.36 (0.20-0.51)	0.001	0.39 (0.04-0.87)	0.33 (0.12-1.06)	0.460
<i>Ruminococcus</i>	0.56 (0.01-3.60)	1.15 (0.64-1.66)	0.616	4.26 (2.18-6.34)	1.57 (0.39-3.37)	0.097	1.01 (0.05-3.15)	4.43 (2.07-6.79)	0.030	1.09 (0.08-2.90)	0.70 (0.37-1.79)	0.475
<i>Serratia</i>	0.69 (0.16-1.89)	1.41 (0.40-2.03)	0.196	0.26 (0.09-0.66)	1.02 (0.26-1.34)	0.004	0.71 (0.19-0.93)	0.58 (0.41-0.76)	0.475	0.19 (0.06-0.92)	1.06 (0.22-1.89)	0.091
<i>Shackia</i>	0.09 (0.04-0.23)	0.07 (0.02-0.11)	0.386	1.44 (0.68-2.20)	0.25 (0.06-0.62)	0.012	0.22 (0.05-0.87)	0.13 (0.04-2.35)	0.186	0.09 (0.02-0.86)	0.30 (0.06-1.10)	0.338
<i>Streptococcus</i>	9.15 (5.45-12.85)	13.87 (8.29-19.46)	0.059	3.08 (1.02-17.04)	5.94 (4.43-7.46)	0.939	8.36 (5.98-10.74)	9.86 (6.06-12.75)	0.294	7.82 (4.97-10.67)	4.86 (3.37-6.35)	0.052
<i>Veillonella</i>	0.44 (0.09-1.24)	1.07 (0.14-2.07)	0.120	0.15 (0.05-1.39)	0.26 (0.06-1.14)	0.386	0.14 (0.04-0.78)	0.14 (0.08-0.27)	0.553	0.11 (0.03-0.41)	0.34 (0.23-0.46)	0.176



Table 3. Initial levels of immunological compounds detected in faecal samples and changes related to the product intake

	Baseline		<i>B. infantis</i> R0033		<i>L. helveticus</i> R0052		<i>B. bifidum</i> R0071		Placebo		Change
	n	Median (IQR)	Median (IQR)	P <sup>a</sup>	Median (IQR)	P <sup>a</sup>	Median (IQR)	P <sup>a</sup>	Median (IQR)	P <sup>a</sup>	P <sup>b</sup>
<b>Calprotectin</b>	79	1.49 (0.91 - 2.44)	0.42 (-0.89 - 1.96)	0.639	-0.15 (-0.38 - 0.75)	0.973	0.69 (-1.62 - 1.21)	0.738	-0.12 (-0.83 - 1.07)	0.442	0.943
<b>Proinflammatory cytokines</b>											
IL-1 $\beta$	79	8.90 (2.24 - 28.46)	-0.41 (-45.44 - 14.76)	0.599	0.03 (-22.52 - 5.85)	0.633	4.94 (-14.75 - 1.87)	0.241	4.28 (-6.13 - 22.99)	0.181	0.365
IL-6	22	2.83 (1.38 - 8.17)	0 (-0.32 - 0.01)	0.624	0 (0 - 0)	0.402	0 (0 - 0)	0.272	0 (0 - 0)	0.423	0.794
IL-12	58	1.63 (0.68 - 4.05)	0.14 (0 - 4.58)	0.142	-0.15 (-4.50 - 8.72)	0.892	0 (-2.15 - 6.11)	0.587	0.13 (-0.19 - 1.41)	0.478	0.813
IL-13	8	0.26 (0.15 - 0.59)	0 (0 - 0)	NA	0 (0 - 0)	NA	0 (-0.11 - 0)	0.036	0 (0 - 0)	NA	NA
IL-17	21	8.78 (5.62 - 278.18)	0 (0 - 0)	0.418	0 (-15.31 - 0)	0.170	0 (-0.95 - 0)	0.636	0 (0 - 0)	0.529	0.273
INF $\gamma$	16	28.26 (8.88 - 137.95)	0 (0 - 46.74)	0.036	0 (-46.18 - 0)	0.108	0 (0 - 1.94)	0.363	0 (0 - 0)	0.826	0.008
TNF- $\alpha$	37	1.47 (0.42 - 7.60)	0 (-0.35 - 19.89)	0.120	0 (0 - 1.54)	0.666	0 (-2.57 - 2.19)	0.754	0 (0 - 0.37)	0.022	0.709
<b>Antiinflammatory cytokines</b>											
IL-2	4	3.93 (2.85 - 10.01)	0 (0 - 0)	NA	0 (0 - 0)	NA	0 (0 - 0)	NA	0 (0 - 0)	NA	0.245
IL-4	20	0.49 (0.06 - 1.72)	0 (0 - 0.53)	0.610	0 (-0.26 - 0)	0.625	0 (-0.05 - 0)	0.813	0.05 (0 - 0.22)	0.009	0.042
IL-10	63	0.70 (0.35 - 1.63)	0 (-0.10 - 1.25)	0.625	0.30 (-0.97 - 0.056)	0.421	-0.10 (-1.24 - 0.07)	0.080	-0.04 (-0.25 - 0.14)	0.979	0.493
<b>Growth factors</b>											
IL-5	20	10.37 (3.05 - 134.89)	0 (0 - 19.67)	0.107	0 (-11.36 - 0.94)	0.727	0 (0 - 5.36)	0.234	0 (0 - 0)	0.098	0.526
IL-7	19	23.68 (5.92 - 30.76)	0 (-9.94 - 0.95)	0.800	0 (0 - 0)	1.000	0 (0 - 0)	0.181	0 (0 - 0)	NA	0.358
G-CSF	54	4.77 (1.39 - 7.16)	0 (-0.51 - 4.29)	0.450	0 (-11.70 - 1.47)	0.478	-1.69 (-3.76 - 0)	0.050	0.32 (0 - 8.35)	0.103	0.120
GM-CSF	11	11.31 (1.45 - 32.70)	0 (0 - 0)	0.281	0 (0 - 0)	0.415	0 (0 - 0)	0.100	0 (0 - 0)	0.371	0.293
<b>Chemokines</b>											
IL-8	77	2.15 (0.85 - 3.70)	-0.14 (-1.50 - 1.33)	0.847	-0.15 (-1.58 - 3.14)	1.000	-0.25 (-1.26 - 0.57)	0.441	0.58 (0.04 - 3.14)	0.012	0.142
GRO $\alpha$	6	11.49 (7.58 - 20.76)	0 (0 - 0)	NA	0 (0 - 0)	1.000	0 (0 - 0)	0.100	0 (0 - 0)	0.371	NA
MCP-1	19	175.65 (14.94 - 100.60)	0 (0 - 3.03)	0.100	0 (-135.53 - 0)	0.197	0 (0 - 20.60)	0.083	0 (0 - 0)	0.624	0.124
MIP-1 $\beta$	13	2.34 (1.09 - 4.15)	0 (0 - 0.11)	0.402	0 (0 - 0)	0.787	0 (0 - 0)	0.100	0 (0 - 0)	1.000	0.189
<b>Immunoglobulines</b>											
IgG1	73	176.90 (75.89 - 361.55)	0 (-309.95 - 326.17)	0.970	1.16 (-61.04 - 135.63)	0.374	-20.03 (-91.87 - 61.17)	0.490	-37.69 (-91.57 - 14.23)	0.304	0.432
IgG2	77	17.00 (5.41 - 31.09)	-2.41 (-10.99 - 94.28)	0.639	-0.89 (-5.75 - 1.50)	0.517	-10.23 (-49.81 - 3.81)	0.182	-0.39 (-3.12 - 0.37)	0.734	0.262
IgG3	67	26.01 (5.10 - 106.03)	0 (-10.63 - 41.14)	0.615	2.40 (-204.89 - 48.15)	0.191	0 (-29.07 - 24.86)	0.794	-1.93 (-17.48 - 24.02)	0.887	0.728
IgG4	75	6.94 (4.11 - 15.67)	1.07 (-10.09 - 33.49)	0.389	-0.67 (-2.93 - 3.39)	0.946	-2.82 (-13.41 - 0.79)	0.123	0.72 (-8.58 - 2.99)	0.832	0.363
IgM	79	25.00 (9.03 - 50.22)	-11.09 (-4.57 - 81.58)	0.934	0.28 (-28.81 - 5.77)	1.000	-8.76 (-18.80 - 10.52)	0.275	-4.49 (-12.34 - 0.24)	0.212	0.976
IgA	79	3.87 (1.42 - 14.00)	-0.37 (-4.44 - 0.63)	0.120	-0.18 (-2.23 - 1.04)	0.919	-0.86 (-8.77 - 0.25)	0.595	-0.26 (-3.37 - 6.14)	1.000	0.569

Concentration and changes of calprotectin, IgG<sub>2</sub> and IgM were expressed in  $\mu\text{g/g}$  feces; cytokines, chemokines and growth factors were  $\text{pg/g}$  feces; IgA were in  $\text{mg/g}$  feces and the rest of the Ig's was in  $\text{ng/g}$ .

n, number of samples where the analyte has been detected at baseline level

<sup>a</sup> Wilcoxon signed rank test was used to evaluate the changes on each group.

<sup>b</sup> Kruskal-Wallis test was used to evaluate changes within groups during treatment period.

### Linear models

Infants were divided in three groups depending on type of feeding (human milk, formula, and mixed) and the effect of age and treatment group on the faecal microbiota was studied using linear models. The genus *Blautia* was the only one which showed differences within the feeding groups. The infants in the probiotic groups fed with human milk or mixed milk sources showed a decrease in the presence of *Blautia*. Although this decrease was not statistically significant, infants fed with formula and taking either *B. infantis* R0033 or *B. bifidum* R0071 showed a significant decrease in *Blautia* levels in contrast to formula fed infants taking the placebo or *L. helveticus* R0052 (data not shown).

### Multifactorial analysis

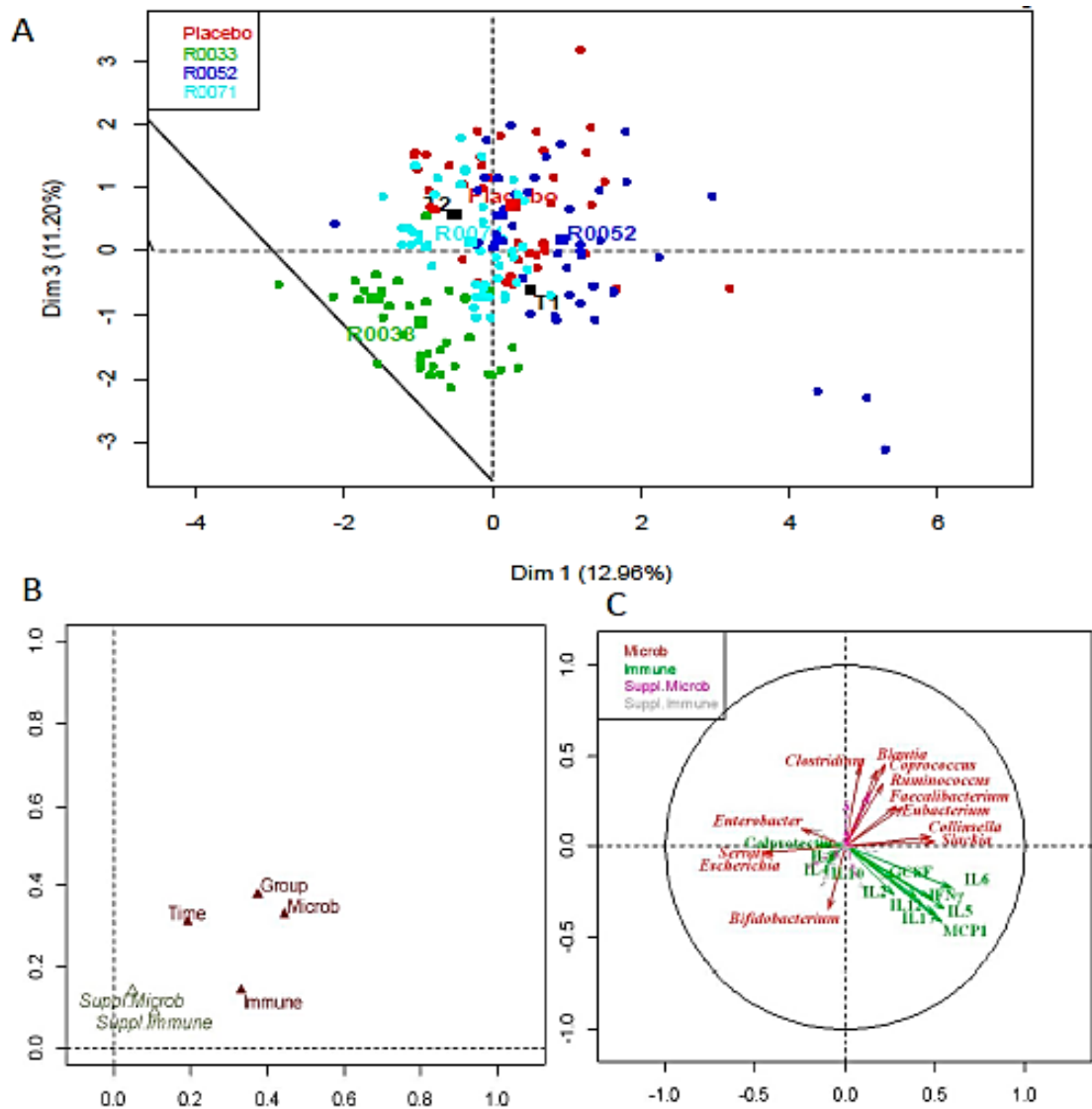
Principal component analysis (PCA) of the immune compounds and bacterial genera was used to explore data relationships and assess for tentative pooling of the infants according to the intervention groups and time of sampling. In addition, these PCAs were used to identify variables involved in subject classification. The greatest contributing variables to the first five principal components of each one of the PCAs were used for subsequent multivariate factorial analysis (MFA) (Figure 2). This included the intervention group (Group) and the time at which the samples were collected (Time).

Thus, the selected variables from the PCAs were: IL2, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL17, GCSF, IFN $\gamma$ , MCP1 and calprotectin and *Bifidobacterium*, *Escherichia*, *Blautia*, *Collinsella*, *Ruminococcus*, *Serratia*, *Faecalibacterium*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Slackia*, *Coprococcus* and *Eubacterium*. The remaining variables were included in the MFA as supplementary variables (IL1 $\beta$ , IL7, IL13 GMCSF, MIP1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , GRO $\alpha$ , IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, IgG<sub>4</sub>, IgM and IgA as immunological compounds) and

*Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus*, *Alkaliphilus* and *Klebsiella* as bacterial genera (Figure 2). Four dimensions were obtained from the MFA with an eigenvalue > 1 that explained 49% of the variability of the whole data sheet. The main contribution to Dim1 was that of the immunological variables. Dim2 was a mixture with some immune and microbial variables but with small weights while Dim3 was contributed overall by microbial variables. Additionally, both Dim2 and Dim3 had a very similar eigenvalue (1.197 and 1.159, respectively) and explained a similar percentage of variability (11.56% and 11.20%, respectively). Therefore, the selected dimensions for the subsequent charts were Dim1 and Dim3. Subjects were clearly separated depending on the treatment group and time of sampling and standing out were those subjects from the *B. infantis* R0033 and *B. bifidum* R0071 probiotic groups (Figure 2A). A relationship between microbial variables and treatment group was established (Figure 2B). Comparison of the subjects chart (Figure 2A) and the variables chart (Figure 2C) shows a relationship between the genus *Bifidobacterium* and the *B. infantis* R0033 group. Moreover, subjects from the *L. helveticus* R0052 group at T1 accurately correlate with the pro-inflammatory immunological compounds. Finally, the correlation of intervention group and time was statistically significant for the four dimensions extracted with an eigenvalue > 1 ( $P < 0.001$  and  $P < 0.001$ , respectively).

## 4. Discussion

The objective of the present study was to analyze gut microbiota composition and faecal immune compounds in healthy infants before and after the intake of three probiotic strains over an 8-week period. The effect of probiotic strains on the gut microbial composition and immune parameters has been widely



**Figure 2: Multifactorial Analysis of the most abundant genera and immune compounds detected in faecal samples of infants before (T1) and after (T2) treatment period.** A) Subjects are represented with different colors depending on the treatment group (circles); the mean centre of the factors (groups and time, squares) are also shown. B) Chart of the coordinates' means for factors and variables (triangles), active factors and variables in red and supplemental variables in grey. C) Chart of variables representing active microbiological variables (continuous red arrows), active immune variables (continuous green arrows), supplemental microbiological variables (discontinuous magenta arrows) and supplemental immune variables (discontinuous grey arrows).

studied in children with health issues such as allergy (Abrahamsson et al., 2009; Berni Canani et al., 2016; Lahtinen et al. 2009), colics (Mentula et al., 2008), celiac disease (Klemenak et al., 2015) or preterm infants (Campeotto et al, 2011; Mohan et al., 2006; Moles et al., 2015).

However, few studies have focused on healthy infants (Wu et al, 2016; Maldonado et al., 2010, Maldonado-Lobon et al., 2015) and to our knowledge none have used 16S rDNA sequencing or studied such a wide range of immune compounds.

The results obtained in this study show the predominance of bifidobacteria in faecal samples of healthy infants. In accordance with previous studies, the most abundant *Bifidobacterium* species was *B. longum* (Klassens et al., 2009; Turroni et al., 2012). The abundance of most of the *Bifidobacterium* species decreased only in the placebo group after the 8-week intervention period. Concurrently, genera such as *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*,

*Coprococcus* and *Faecalibacterium*, which are all common constituents of healthy adult gut microbiota (Ringel-Kulka, T. et al. 2013), increased in the placebo group. Therefore, infants in the placebo group showed a faecal bacterial composition closely related to the weaning process and older infants (Cheng et al., 2016). On the other hand, a microbiome like the microbiome richness of a 4-month old was present after the intervention period in the probiotic groups, which indicated a positive impact of the probiotic strains as shown by linear models. This microbiome is rich in bacteria that are able to digest lactose – present in high quantities in diets mainly composed of milk.

In this study, multiplexing and/or ELISA immunoassays were used to measure immunological compounds in faecal samples of healthy infants to assess their gastrointestinal tract immunological status and possible changes during the intervention. This allowed for the evaluation of the potential modulatory effects associated with the intake of the probiotic strains compared to the basal behavior in the placebo group.

Relevant differences in a wide range of cytokines were found in infants with allergic and non-allergic mothers when comparing serum, cord blood and stool filtrates (Prokesova et al. 2006). Thus, to evaluate the local behavior of the GALT (gut associated lymphoid tissue), measurement of immune compounds in faecal samples may be used (Prokesová et al., 2006).

Until now, the effects of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains on the immune system have been assessed frequently but most studies focus on only a small number of immune markers such as sIgA and/or calprotectin (Sholtens et al., 2008; Van de Ven et al., 2014; Wang et al., 2014; Sierra et al., 2015). Consequently, the underlying mechanisms of their effects have scarcely been elucidated (Hevia et al.,

2015). The application of multiplex technology to study the immunological composition in faecal samples is quite recent, but has previously been used to evaluate the effect of a probiotic intervention on the faecal immune profile in very low birth weight preterm infants (Moles et al., 2015). A modulation effect was exerted by *B. infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 and *B. bifidum* R0071 during the intervention period, while a significant increase in pro-inflammatory compounds was observed in the placebo group, indicated by changes in IL-10/IL-12 and TNF $\alpha$ /IL-10 ratios. Furthermore, a different effect in these pro-inflammatory and anti-inflammatory ratios was exerted by *B. infantis* R0033 and *L. helveticus* R0052, proving a strain specific effect that was also confirmed with the MFA. This statistical multifactorial tool highlighted the modulatory effect of *B. infantis* R0033 and *B. bifidum* R0071 revealing a link between microbial composition and immunological compounds present in faecal samples. High levels of bifidobacteria in the infant gut have been associated with timely and appropriate development and maturation of the immune system (Hart, et al. 2004). Our results may be a starting point to understand why different probiotic strains may modulate the microbiota composition and the immune system associated to the gastrointestinal tract of infants during their first year of life.

In conclusion, the results of this study indicate an effect of the three probiotic strains on gut bacterial composition, resulting in a younger microbiome species profile at the end of the intervention period compared to the placebo group. Lower levels of *Bifidobacterium* spp. and higher levels of *Bacteroides* spp., *Blautia* spp. and *Collinsella* spp. in gut microbiota are related to a pro-inflammatory profile.

### Conflict of interest

This work was supported by Lallemand Health Solutions Inc. (Montreal,

Canada). The authors declared no conflict of interest.

## Acknowledgements

We acknowledge all the families that participated in this study.

## References

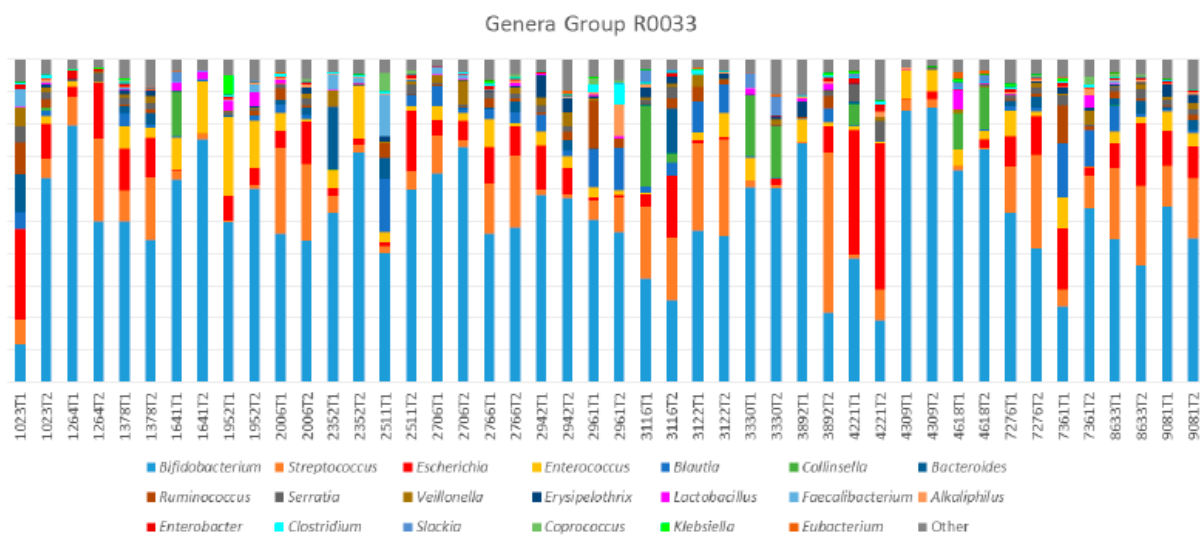
- Abrahamsson TR, Sinkiewicz G, Jakobsson T, Fredrikson M, Björkstén B. Probiotic lactobacilli in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009;49(3):349-54.
- Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, Calignano A, Khan AA, Gilbert JA, Nagler CR. Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J.* 2016;10(3): 742-50.
- Blanco-Quiros A, Arranz E, Solis G, Villar A, Ramos A, Coto D. (2000). Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *Eur J Pediatr.* 159:420-423.
- Campeotto F, Suau A, Kapel N, Magne F, Viallon V, Ferraris L, Waligora-Dupriet AJ, Soulaines P, Leroux B, Kalach N, Dupont C, Butel MJ. A fermented formula in pre-term infants: clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. *Br J Nutr.* 2011;105(12):1843-51.
- Cheng J, Ringel-Kulka T, Heikamp-de Jong I, Ringel Y, Carroll I, de Vos WM, Salojärvi J, Satokari R. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *ISME J.* 2016, 10(4):1002- 14.
- Desantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, et al. (2006) Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 72 (7):5069-5072.
- Dore, J., Ehrlich, S.D., Levenez, F., Pelletier, E., Alberti, A., Bertrand, L., Bork, P., Costea, P.I., Sunagawa, S., Guarner, F., Manichanh, C., Santiago, A., Zhao, L., Shen, J., Zhang, C., Versalovic, J., Luna, R.A., Petrosino, J., Yang, H., Li, S., Wang, J., Allen-Vercoe, E., Gloor, G., Singh, B. and IHMS Consortium (2015). IHMS\_SOP 06 V1:Standard operating procedure for faecal samples DNA extraction, Protocol Q. International Human Microbiome Standards. <http://www.microbiome-standards.org>.
- Francino MP. Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens.* 2014;3(3):769-90.
- Gil-Campos M, Lopéz MA, Rodríguez-Benítez MV, Romero J, Roncero I, Linares MD, Maldonado J, López-Huertas E, Berwind R, Ritzenthaler KL, Navas V, Sierra C, Sempere L, Geerlings A, Maldonado-Lobón JA, Valero AD, Lara-Villoslada F, Olivares M. (2012). Lactobacillus fermentum CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1-6 months of age: A randomized controlled trial. *Pharmacological Research* 65:231-238.
- Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004;53:1602-9.
- Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Korpela R. (2001). Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised . *BMJ* . 322:1-5.
- Hevia A, Delgado S, Sánchez B, Margolles A. Molecular Players Involved in the Interaction Between Beneficial Bacteria and the Immune System. *Front Microbiol.* 2015; 6:1285.
- Hill, C., Guarner F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., et al. (2014). Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement of the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 11,506-514.
- Holscher HD, Czerkies LA, Cekola P, Litov R, Benbow M, SantemaS, Alexander DD, Perez V, Sun S, Saavedra JM, Tappenden KA. (2012). Bifidobacterium lactis Bb12 Enhances Intestinal Antibody Response in Formula-Fed Infants: A Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition.* 36:106S-117S
- Johansson MA, Saghafian-Hedengren S, Haileselassie Y, Roos S, Troye-Blomberg M, Nilsson C, Sverremermark-Ekström E. (2012). Early-Life Gut Bacteria Associate with IL-4 IL-10 and IFN- $\gamma$  Production at Two Years of Age. *PLOS ONE.* 7(11): e49315.
- Kapel N, Campeotto F, Kalach N, Baldassare M, Butel MJ, Dupont C. Faecal Calprotectin in Term and Preterm Neonates. *JPGN* 2010;50:1-6.
- Klaassens ES, Boesten RJ, Haarman M, Knol J, Schuren FH, Vaughan EE, de VosWM. Mixed-species genomic microarray analysis of faecal samples reveals differential transcriptional responses of bifidobacteria in breast- and formula-fed infants. *Appl Environ Microbiol* 2009;75:2668-2676
- Klemenak M, Dolinšek J, Langerholc T, Di Gioia D, Mičetić-Turk D. Administration of Bifidobacterium breve decreases the production of TNF- $\alpha$  in children with celiac disease. *Dig Dis Sci.* 2015;60(11):3386-92.
- Konikoff MR & Denson LA. Role of faecal calprotectin as a biomarker of intestinal inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(6):524-34.
- Kullen MJ, Sanosky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR (2000) Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex. *J Appl Microbiol* 89: 511-516.
- Lagier JC, Armougom F, Million M, Hugon P, Pagnier I, Robert C, Bittar F, Fournous G, Gimenez G, Maraninchi M, Trape JF, Koonin EV, La Scola B, Raoult D. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome



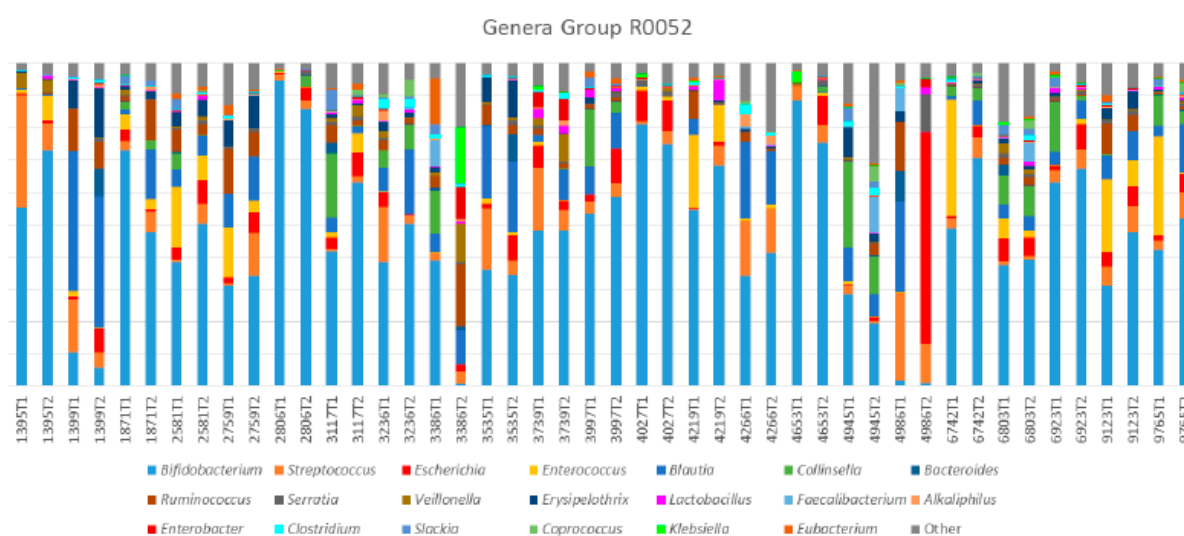
- study. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(12):1185-93.
- Lahtinen SJ, Boyle RJ, Kivivuori S, Oppedisano F, Smith KR, Robins-Browne R, Salminen SJ, Tang MLK: Prenatal probiotic administration can influence *Bifidobacterium* microbiota development in infants at high risk of allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:499-501.
- Lusyati, C. V. Hulzebos, J. Zandvoort, H. Sukandar, and P. J.J. Sauer. (2013). Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, 6(2):153-163
- Maldonado J, Lara-Villoslada F, Sierra S, Sempere L, Gómez M, Rodríguez JM, Boza J, Xaus J, Olivares M. Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in 6-month-old children. *Nutrition.* 2010;26(11- 12):1082-7.
- Maldonado-Lobón JA, Gil-Campos M, Maldonado J, López-Huertas E, Flores-Rojas K, Valero AD, Rodríguez-Benítez MV, Bañuelos O, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Olivares M. Long-term safety of early consumption of *Lactobacillus fermentum* CECT5716: A 3-year follow-up of a randomized controlled trial. *Pharmacol Res.* 2015;95-96:12-9.
- Manzano S, De Andrés J, Castro I, Rodríguez JM, Jiménez E, Espinosa-Martos I. Safety and tolerance of three probiotic strains in healthy infants: a multi-centre randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Beneficial Microbes.* 2017;30:1-10.
- Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.* 2013;21(4):167-73.
- Matoba N, Yu Y, Mestan K, Pearson C, Ortiz K, Porta N, Thorsen P, Skogstrand K, Hougaard DM, Zuckerman B, Wang X. (2009). Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics.* 123:1320-1328.
- Maynard CL, O'Elson C, Halton RD, Weaver CT. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature.* 489: 231-241.
- Mentula S, Tuure T, Koskenala R, Korpela R, Kononen E: Microbial composition and faecal fermentation end products from colicky infants - a probiotic supplementation pilot. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2008;20:37-47
- Mohan R, Koebnick C, Schildt J, Schmidt S, Mueller M, Possner M, Radke M, Blaut M., Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *J Clin Microbiol* 2006; 44(11):4025-4031.
- Moles L, Escribano E, de Andrés J, Montes MT, Rodríguez JM, Jiménez E, Sáenz de Pipaón M, Espinosa-Martos I. Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study. *J Immunol Res.* 2015;2015:538171.
- Olivares M, Castillejo G, Varea V, Sanz Y (2014). Double-blind, randomised, placebo- controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *British Journal of Nutrition.* 112: 30-40
- Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Campaña-Martin L, Matencio E, Ortuño I, Martínez- Silla R, Gomez-Gallego C, et al. Safety and Immunomodulatory Effects of Three Probiotic Strains Isolated from the Feces of Breast-Fed Infants in Healthy Adults: SETOPROB Study. *PLoS One.* 2013 Oct 28;8(10):e78111.
- Prokesová L, Lodinova -Zádníková R, Zizka J, Kocourková I, Novotná-O, Petrásková P, Sterzl I. (2006). Cytokine levels in healthy and allergic mothers and their children during the first year of life. *Pediatr Allergy Immunol.* 17:175-183.
- Ringel-Kulka, T. et al. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults—a high throughput microarray analysis. *PLoS One* 8, e64315 (2013).
- Rijkers GT, de Vos WM, Brummer RJ, Morelli L, Corthier G, Marteau P. Health benefits and health claims of probiotics: bridging science and marketing. *Br J Nutr.* 2011 Nov; 106(9):1291-6.
- Rugtveit J, Fagerhol MK. (2002). Age-dependent variations in faecal calprotectin concentrations in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 34: 323-5
- Sholtens PAMJ, Alliet P, Raes M, Alles MS, Kroes H, Boehm G, Knippen LMJ, Knol J, Vandenpla Y. (2008). Faecal Secretory Immunoglobulin A Is Increased in Healthy Infants Who Receive a Formula with Short-Chain Galacto-Oligosaccharides and Long-Chain Fructo-Oligosaccharides. *J. Nutr.* 138: 1141-1147.
- Sierra C, Bernal MJ, Blasco J, Martínez R, Dalmau J, Ortuño I, Espín B, Vasallo MI, Gil D, Vidal, ML, Infante D, Leis R, Maldonado J, Moreno JM, Román E. (2015). Prebiotic effect during the first year of life in healthy infants fed formula containing GOS as the only prebiotic: a multicentre, randomised, double-blind and placebo-controlled trial. *Eur J Nutr.* 54:89-99
- Sjögren YM, Tomicic S, Lundberg A, Faregas-Böttcher M, Björkstén B, Sverremark- Ekström E, Jenmalm M. (2009). Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clinical and Experimental Allergy*, 39 (12): 1842-1851.
- Van de Ven AAJM, Jansen WJM, Schulz LS, Van Loon AM, Voorkamp K, Sanders EAM, Kusters JG, Nierkens S, Boes M, Wensing AMJ, Van Montfrans JM. (2014). Increased Prevalence of Gastrointestinal Viruses and Diminished Secretory Immunoglobulin A Levels in Antibody Deficiencies. *J Clin Immunol* (2014) 34:962-970
- Van Niel CW. Probiotics: not just for treatment anymore. *Pediatrics.* 2005; 115(1):174-177.
- Zeissig S, Blumberg RS. Commensal microbial regulation of natural killer T cells at the frontiers of the mucosal immune system. *FEBS Lett.* 2014; 588(22):4188-94.
- Wan AKL, Seow WK, Purie MD, Bird SP, Walsh LJ, Tudehope DI. (2003). Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. A longitudinal study from 0-18 months of age. *Oral Microbiology Immunology.* 18:72-78.

- Wind RD, Tolboom H, Klare I, Huys G, Knol J. Tolerance and safety of the potentially probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* PRSFL477: a randomised, double-blind placebo-controlled trial in healthy volunteers. *Br J Nutr* 2010, 104: 1806-1816.
- World Health Organization and Food & Agriculture Organization (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a joint
- FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.
- Wu BB, Yang Y, Xu X, Wang WP. Effects of bifidobacterium supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World J Pediatr*. 2016;12(2):177-82.

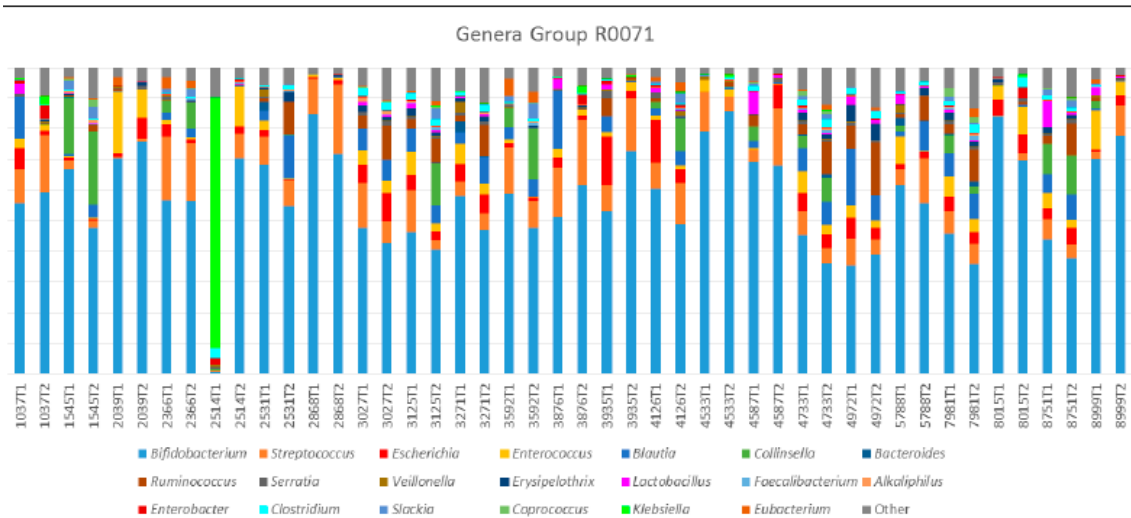
**Figure S1. Genera detected both at the beginning and at the end of the intervention period in the faecal samples from infants of the *B. infantis* R0033 group**



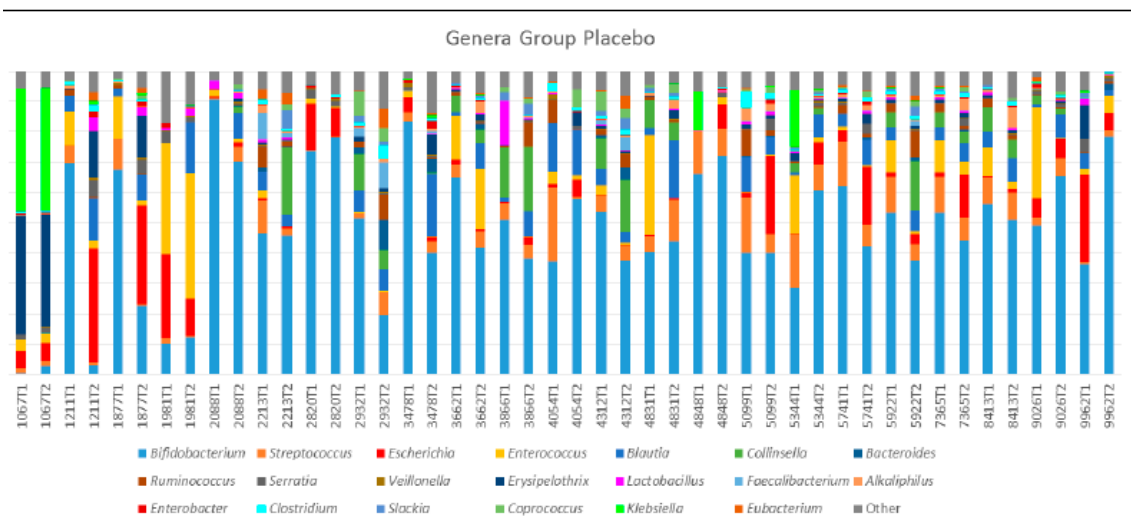
**Figure S2. Genera detected both at the beginning and at the end of the intervention period in the faecal samples from infants of the *L. helveticus* R0052 group**



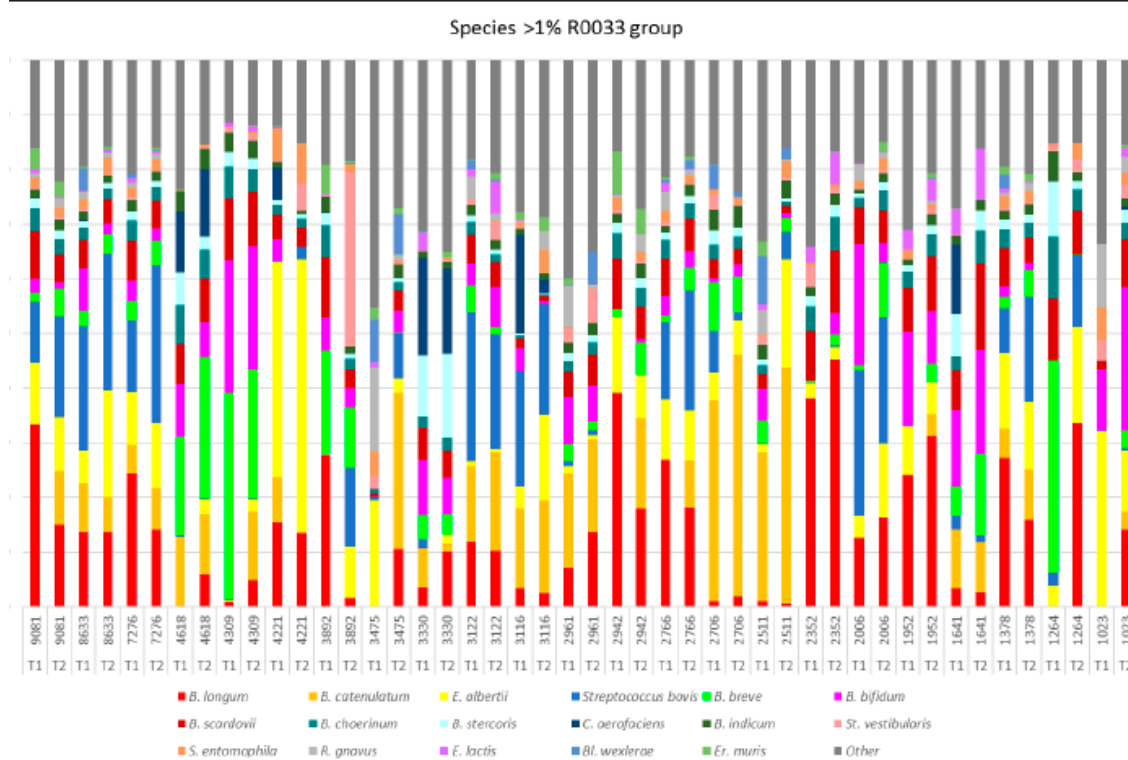
**Figure S3. Genera detected both at the beginning and at the end of the intervention period in the faecal samples from infants of the *B. bifidum* R0071 group**



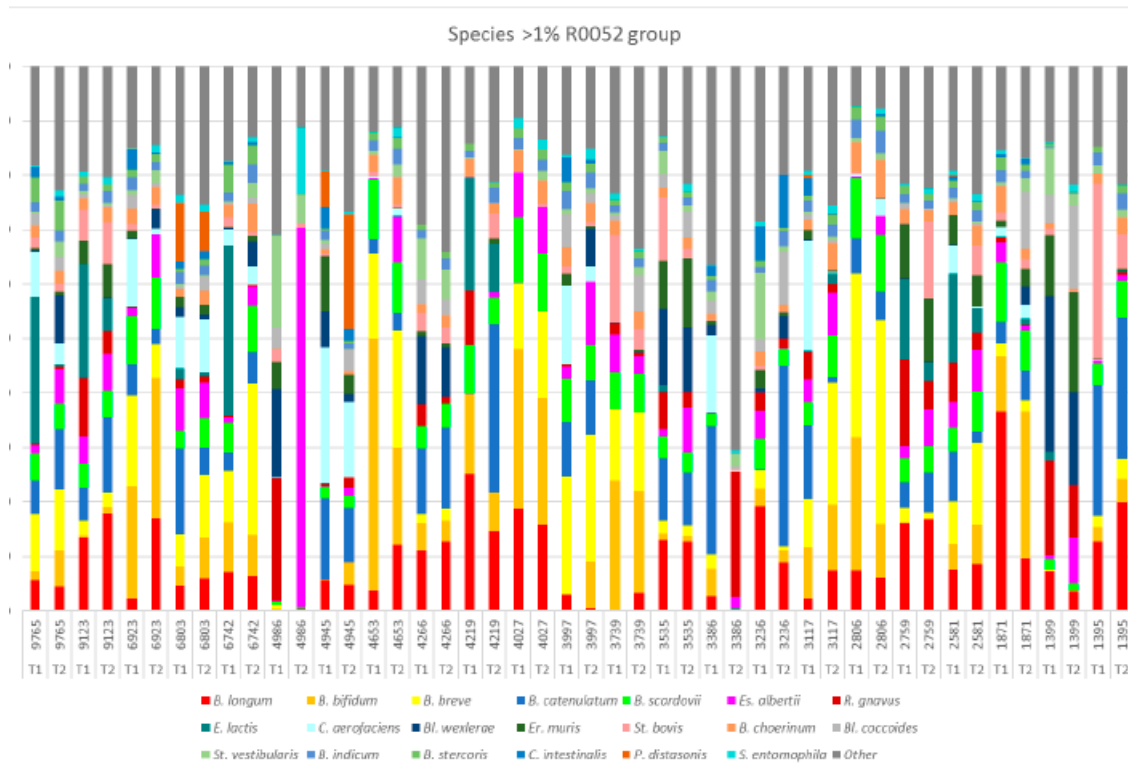
**Figure S4. Genera detected both at the beginning and at the end of the intervention period in the faecal samples from infants of the placebo group**



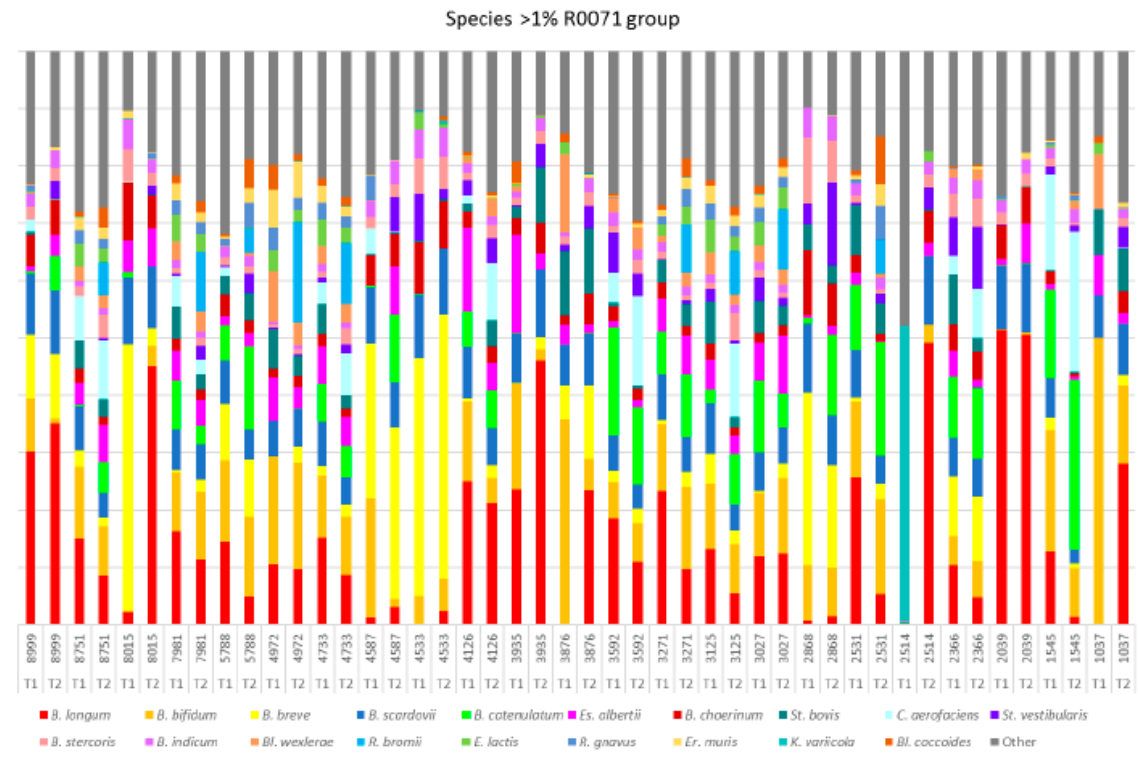
**Figure S5. Species representing >1% detected both at the beginning and at the end of the intervention period in the faecal samples from infants of the *B. infantis* R0033 group**



**Figure S6. Species representing >1% detected both at the beginning and at the end of the intervention period in the faecal samples from infants of the *L. helveticus* R0052 group**



Species >1% R0071 group



Species >1% Placebo group

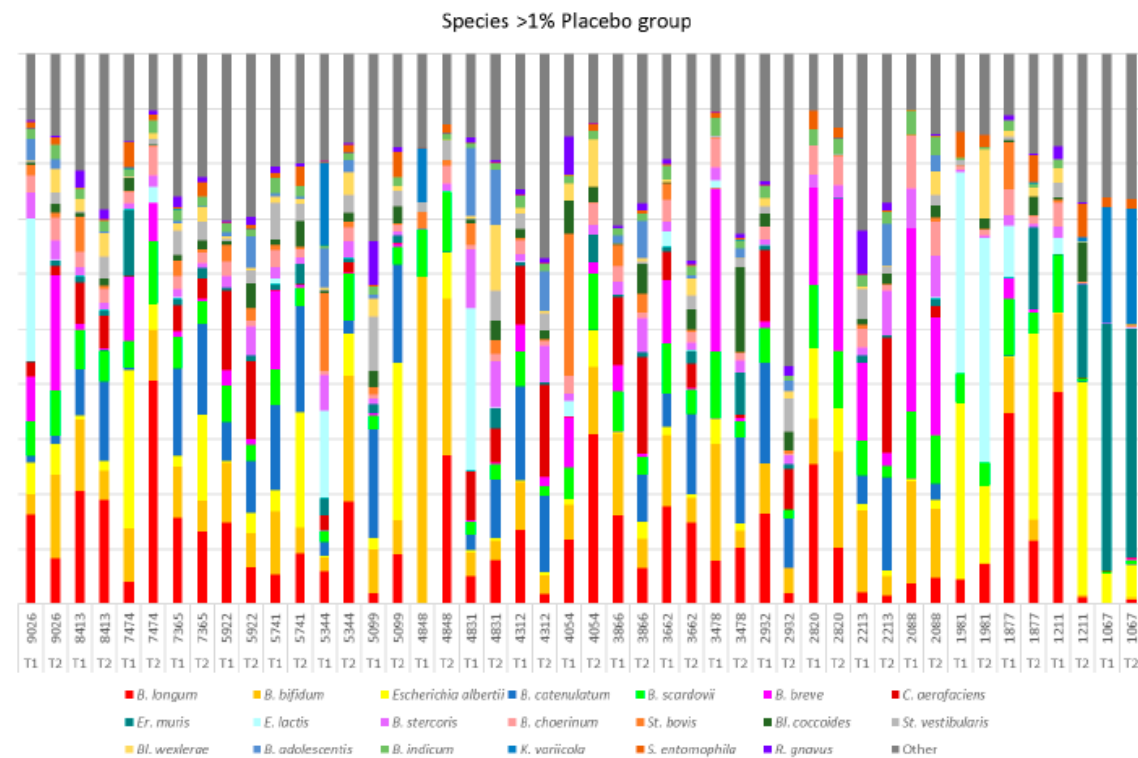




Table S1. Analysis of the most abundant detected species in faecal samples at the beginning (T1) and the end (T2) of treatment period.

Species	<i>B. infantis</i> R0033			<i>L. helveticus</i> R0052			<i>B. bifidum</i> R0071			Placebo		
	T1	T2	P <sup>a</sup>	T1	T2	P <sup>a</sup>	T1	T2	P <sup>a</sup>	T1	T2	P <sup>a</sup>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	0.00 (0.00-0.01)	0.00 (0.00-0.00)	0.276	0.00 (0.00-0.01)	0.00 (0.00-0.00)	0.089	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-0.55)	0.088	0.00 (0.00-0.60)	0.44 (0.00-2.66)	0.399
<i>Bifidobacterium asteroides</i>	0.48 (0.33-0.63)	0.45 (0.29-0.63)	0.520	0.45 (0.26-0.66)	0.57 (0.31-0.78)	0.223	0.63 (0.55-0.78)	0.58 (0.46-0.70)	0.179	0.62 (0.52-0.72)	0.49 (0.40-0.77)	0.104
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	4.12 (2.34-9.88)	3.58 (1.17-6.57)	0.179	4.72 (0.87-12.35)	7.08 (1.59-10.10)	0.917	11.42 (7.83-16.33)	8.51 (3.95-12.51)	0.169	9.88 (7.10-13.55)	5.38 (3.58-10.73)	0.038
<i>Bifidobacterium breve</i>	2.89 (0.50-5.16)	3.69 (1.85-6.30)	0.427	3.40 (2.14-11.36)	3.59 (0.96-15.46)	0.126	2.13 (0.47-10.10)	2.58 (2.06-10.52)	0.075	3.78 (0.45-11.59)	0.58 (0.33-1.88)	0.014
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	5.06 (0.05-11.60)	9.15 (2.36-16.68)	0.028	6.08 (1.41-11.69)	5.56 (1.56-10.59)	0.870	0.95 (0.07-7.95)	5.83 (0.05-12.07)	0.080	1.37 (0.04-7.81)	8.65 (0.07-14.48)	0.038
<i>Bifidobacterium choerinum</i>	2.73 (1.92-4.39)	2.74 (2.03-3.69)	0.345	2.34 (1.81-3.02)	2.69 (1.88-3.66)	0.300	2.88 (2.12-5.09)	2.81 (1.70-5.75)	0.427	2.83 (1.52-3.66)	1.39 (0.10-2.84)	0.080
<i>Bifidobacterium indicum</i>	1.68 (1.19-2.35)	1.90 (1.48-2.35)	0.098	1.77 (1.47-2.16)	2.03 (1.46-2.71)	0.376	1.58 (1.26-2.42)	2.11 (1.41-2.40)	0.300	1.72 (1.28-2.26)	1.56 (1.17-1.91)	0.376
<i>Bifidobacterium lactis</i>	0.46 (0.07-1.33)	0.84 (0.42-1.55)	0.061	0.66 (0.25-1.13)	0.68 (0.26-1.20)	0.917	0.34 (0.11-0.73)	0.62 (0.08-1.19)	0.065	0.37 (0.07-0.87)	0.89 (0.07-1.37)	0.223
<i>Bifidobacterium longum</i>	12.01 (1.03-25.66)	13.61 (5.47-16.14)	0.988	7.31 (3.36-13.14)	8.74 (4.69-13.64)	0.988	13.23 (1.74-21.00)	9.84 (5.16-25.88)	0.777	11.78 (4.28-16.44)	9.02 (5.70-14.02)	0.687
<i>Bifidobacterium scardovii</i>	6.91 (4.46-8.28)	5.21 (4.08-8.01)	0.300	4.53 (3.92-8.33)	5.34 (4.13-7.49)	0.731	7.75 (6.95-9.36)	6.56 (5.07-9.91)	0.075	6.40 (5.40-8.84)	3.75 (2.88-8.44)	0.065
<i>Bifidobacterium stercoris</i>	1.63 (1.16-2.40)	1.47 (0.99-1.84)	0.151	1.25 (0.83-1.66)	1.22 (0.88-1.71)	0.846	1.34 (1.12-2.09)	2.25 (1.21-2.63)	0.200	1.87 (1.19-2.32)	1.71 (1.02-4.42)	0.870
<i>Blautia coecoides</i>	0.15 (0.03-1.10)	0.08 (0.03-0.55)	0.223	0.96 (0.24-2.37)	0.76 (0.23-3.54)	0.501	0.75 (0.10-1.24)	0.42 (0.03-1.60)	0.315	0.43 (0.11-0.99)	2.07 (1.50-3.57)	0.004
<i>Blautia weizmanni</i>	0.02 (0.02-1.19)	0.03 (0.02-0.31)	0.329	0.13 (0.03-1.87)	0.13 (0.01-4.29)	0.665	1.03 (0.02-2.94)	0.65 (0.02-2.57)	0.988	0.46 (0.06-1.37)	1.02 (0.35-4.14)	0.035
<i>Collinsella aerofaciens</i>	0.03 (0.01-0.19)	0.01 (0.00-0.01)	0.007	0.20 (0.02-8.77)	0.02 (0.01-2.71)	0.056	0.02 (0.01-3.55)	0.07 (0.01-7.84)	0.393	0.10 (0.01-6.36)	1.73 (0.02-6.07)	0.501
<i>Collinsella insectalis</i>	0.01 (0.00-0.05)	0.00 (0.00-0.00)	0.007	0.05 (0.00-2.08)	0.03 (0.00-0.63)	0.346	0.01 (0.00-0.55)	0.01 (0.00-1.19)	0.346	0.01 (0.00-0.92)	0.28 (0.01-0.96)	0.427
<i>Eggerthella lenta</i>	0.65 (0.06-0.86)	0.73 (0.02-1.31)	0.189	0.08 (0.01-0.41)	0.40 (0.04-1.09)	0.235	0.63 (0.01-1.27)	0.43 (0.12-1.29)	0.917	0.46 (0.00-0.88)	0.47 (0.01-1.22)	0.687
<i>Enterococcus anium</i>	0.03 (0.01-0.47)	0.01 (0.00-0.21)	0.070	0.02 (0.00-0.10)	0.00 (0.00-0.86)	0.808	0.03 (0.00-0.91)	0.10 (0.00-0.48)	0.259	0.01 (0.00-0.02)	0.01 (0.00-0.11)	0.922
<i>Enterococcus lactis</i>	0.63 (0.05-1.22)	0.10 (0.01-0.78)	0.893	0.08 (0.02-8.52)	0.05 (0.01-0.93)	0.008	0.48 (0.07-3.35)	0.13 (0.02-2.30)	0.001	0.13 (0.03-2.94)	0.03 (0.01-0.17)	0.012
<i>Exiguobacterium muris</i>	0.22 (0.04-1.49)	0.55 (0.05-1.22)	0.893	1.51 (0.13-4.64)	0.71 (0.20-3.41)	0.687	0.12 (0.03-1.86)	0.65 (0.17-1.76)	0.823	0.48 (0.07-1.23)	0.97 (0.63-3.74)	0.119
<i>Escherichia albertii</i>	4.01 (1.11-10.96)	9.20 (2.39-12.93)	0.300	1.46 (0.25-4.35)	6.58 (1.81-8.10)	0.004	3.85 (1.06-6.11)	3.26 (1.58-5.73)	0.777	1.03 (0.32-4.16)	5.50 (1.42-11.34)	0.070
<i>Flabaciella varicicola</i>	0.04 (0.00-0.28)	0.00 (0.00-0.01)	0.006	0.05 (0.00-0.18)	0.00 (0.00-0.02)	0.000	0.01 (0.00-0.01)	0.01 (0.00-0.07)	0.151	0.01 (0.00-0.08)	0.00 (0.00-0.02)	0.119
<i>Ruminococcus bromii</i>	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-0.00)	0.205	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-0.01)	0.001	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-0.79)	0.034	0.00 (0.00-0.00)	0.00 (0.00-0.01)	0.013
<i>Ruminococcus gnavus</i>	0.58 (0.01-3.31)	0.59 (0.00-1.15)	0.315	1.58 (0.19-7.03)	0.72 (0.06-2.27)	0.008	0.51 (0.02-2.42)	0.08 (0.02-1.89)	0.286	0.86 (0.13-1.57)	0.64 (0.25-0.97)	0.234
<i>Serratia entomophila</i>	0.79 (0.21-2.00)	1.59 (0.49-2.23)	0.300	0.29 (0.10-0.78)	1.18 (0.44-1.46)	0.003	0.81 (0.22-1.07)	0.59 (0.33-1.00)	0.580	0.22 (0.07-0.91)	1.23 (0.28-2.12)	0.092
<i>Streptococcus bovis</i>	1.70 (0.18-12.12)	4.90 (0.37-19.78)	0.088	1.27 (0.15-1.99)	0.78 (0.30-3.42)	0.235	3.90 (0.46-6.32)	2.74 (0.34-4.20)	0.105	1.45 (0.15-3.45)	0.41 (0.19-0.80)	0.001
<i>Streptococcus vestibularis</i>	0.60 (0.26-1.34)	0.51 (0.21-1.83)	0.988	0.69 (0.37-1.59)	1.35 (0.48-2.39)	0.893	0.34 (0.10-2.34)	2.48 (1.24-3.91)	0.020	0.20 (0.11-2.21)	2.19 (0.25-3.21)	0.259
Other	11.54 (0.53-15.11)	13.75 (9.89-18.09)	0.520	13.32 (9.76-17.33)	10.79 (8.38-19.74)	0.463	12.25 (9.07-14.46)	12.94 (0.73-16.24)	0.427	13.36 (9.61-18.59)	13.13 (11.31-19.08)	0.846
<b>Shannon Index</b>	<b>2.67 (0.22)</b>	<b>2.65 (0.22)</b>	<b>0.768</b>	<b>2.68 (0.25)</b>	<b>2.72 (0.31)</b>	<b>0.091</b>	<b>2.64 (0.33)</b>	<b>2.74 (0.29)</b>	<b>0.085</b>	<b>2.70 (0.38)</b>	<b>2.75 (0.33)</b>	<b>0.553</b>

Average of relative frequencies and Shannon diversity were expressed as median (IQR).

<sup>a</sup>Wilcoxon signed rank test.

Table S2. Linear model interactions of the confounding factors “group of age” and “feeding type” and “product” with the microbial genera

Genus	Time	Intercept	Group of age			Intervention group				Feeding type			Model	
			1	2	P <sup>a</sup>	R0033	R0052	R0071	P <sup>a</sup>	Mixed	Human milk	P <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	P <sup>b</sup>
<i>Alkaliphilus</i>	T1	<0.000	0.051	0.022	0.048	0.054	0.460	0.023	0.084	0.378	0.285	0.179	0.2131	0.004
	T2	<0.000	0.776	0.058	0.123	0.354	0.026	0.009	0.032	0.012	0.010	0.012	0.205	0.006
<i>Bacteroides</i>	T1	0.450	0.168	0.777	0.204	0.019	0.480	0.698	0.095	0.892	0.962	0.983	0.116	0.154
	T2	0.000	0.421	0.110	0.276	0.425	0.644	0.126	0.137	0.261	0.062	0.165	0.158	0.038
<i>Bifidobacterium</i>	T1	<0.000	0.083	0.377	0.220	0.898	0.594	0.405	0.608	0.035	0.315	0.108	0.147	0.055
	T2	<0.000	0.111	0.082	0.157	0.117	0.322	0.007	0.055	0.177	0.000	0.001	0.344	<0.000
<i>Blautia</i>	T1	<0.000	0.007	0.044	0.020	0.873	0.021	0.440	0.083	0.134	0.126	0.206	0.268	0.000
	T2	<0.000	0.312	0.980	0.511	0.003	0.511	0.021	0.000	0.354	0.015	0.049	0.294	<0.000
<i>Clostridium</i>	T1	<0.000	0.001	0.014	0.003	0.108	0.395	0.638	0.179	0.738	0.856	0.881	0.224	0.003
	T2	<0.000	0.038	0.336	0.113	0.087	0.089	0.841	0.099	0.095	0.095	0.146	0.198	0.008
<i>Collinsella</i>	T1	0.061	0.139	0.264	0.305	0.972	0.214	0.567	0.336	0.469	0.091	0.238	0.073	0.480
	T2	0.000	0.371	0.316	0.546	0.052	0.132	0.666	0.184	0.679	0.325	0.392	0.118	0.143
<i>Coprococcus</i>	T1	<0.000	0.020	0.008	0.017	0.247	0.034	0.142	0.188	0.367	0.326	0.539	0.196	0.009
	T2	<0.000	0.217	0.599	0.462	0.001	0.090	0.001	0.003	0.996	0.463	0.711	0.189	0.011
<i>Enterobacter</i>	T1	0.142	0.199	0.432	0.431	0.178	0.912	0.788	0.505	0.456	0.648	0.749	0.055	0.675
	T2	0.077	0.335	0.905	0.572	0.897	0.239	0.777	0.549	0.521	0.183	0.409	0.048	0.748
<i>Enterococcus</i>	T1	0.001	0.142	0.278	0.313	0.191	0.459	0.069	0.297	0.430	0.469	0.671	0.070	0.507
	T2	0.101	0.822	0.713	0.834	0.921	0.372	0.679	0.803	0.611	0.057	0.151	0.068	0.529
<i>Erysipelothrix</i>	T1	0.011	0.586	0.471	0.754	0.208	0.758	0.224	0.483	0.640	0.593	0.633	0.049	0.739
	T2	0.002	0.891	0.806	0.927	0.022	0.287	0.029	0.071	0.865	0.760	0.900	0.085	0.363
<i>Escherichia</i>	T1	0.038	0.742	0.978	0.934	0.107	0.277	0.957	0.061	0.928	0.238	0.390	0.106	0.208
	T2	0.000	0.923	0.401	0.585	0.681	0.710	0.065	0.130	0.846	0.269	0.512	0.088	0.335
<i>Eubacterium</i>	T1	0.136	0.978	0.682	0.894	0.803	0.128	0.478	0.280	0.273	0.120	0.270	0.088	0.334
	T2	<0.000	0.036	0.603	0.091	0.006	0.028	0.414	0.025	0.831	0.754	0.881	0.181	0.016
<i>Faecalibacterium</i>	T1	0.001	0.045	0.077	0.091	0.359	0.990	0.463	0.442	0.108	0.369	0.268	0.157	0.040
	T2	0.001	0.158	0.625	0.354	0.257	0.865	0.268	0.534	0.132	0.220	0.265	0.112	0.171
<i>Klebsiella</i>	T1	0.540	0.433	0.721	0.502	0.301	0.290	0.775	0.424	0.826	0.117	0.172	0.128	0.104
	T2	0.175	0.641	0.691	0.685	0.188	0.442	0.296	0.580	0.830	0.675	0.827	0.047	0.765
<i>Lactobacillus</i>	T1	0.051	0.195	0.230	0.353	0.620	0.257	0.249	0.152	0.333	0.148	0.328	0.090	0.319
	T2	0.046	0.181	0.363	0.079	0.549	0.854	0.131	0.332	0.154	0.110	0.203	0.125	0.115
<i>Ruminococcus</i>	T1	0.000	0.010	0.850	0.009	0.635	0.041	0.956	0.130	0.182	0.230	0.326	0.254	0.001
	T2	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	0.444	0.264	0.007	0.005	0.560	0.257	0.522	0.400	<0.000
<i>Serratia</i>	T1	0.029	0.704	0.996	0.906	0.109	0.237	0.997	0.052	0.966	0.114	0.201	0.125	0.116
	T2	0.000	0.942	0.323	0.491	0.715	0.841	0.065	0.133	0.779	0.323	0.602	0.089	0.323
<i>Slackia</i>	T1	0.136	0.544	0.416	0.699	0.774	0.022	0.890	0.057	0.982	0.423	0.660	0.095	0.278
	T2	0.001	0.360	0.383	0.586	0.124	0.157	0.958	0.252	0.467	0.399	0.329	0.115	0.157
<i>Streptococcus</i>	T1	<0.000	0.252	0.782	0.486	0.530	0.881	0.847	0.931	0.759	0.178	0.380	0.090	0.321
	T2	0.035	0.029	0.302	0.090	<0.000	0.502	0.047	0.000	0.638	0.018	0.048	0.248	0.001
<i>Veillonella</i>	T1	0.259	0.076	0.154	0.007	0.021	0.136	0.313	0.131	0.598	0.522	0.537	0.173	0.022
	T2	0.106	0.130	0.967	0.223	0.033	0.061	0.898	0.041	0.311	0.883	0.478	0.158	0.038

P-values of the coefficients calculated for the levels of each one of the factors considered to develop the linear model when compare with the group of infants that intake the placebo, feeding formula and had more than 250 days of age at T1 and more than 306 days of age at T2.

<sup>a</sup> P-values obtained in the ANOVA test used to evaluate the relationship within the factors for each one of the genus before and after the treatment

<sup>b</sup> P-values of the fit of the model.





## CAPÍTULO V

---

# DISCUSIÓN GENERAL



## CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL

### V.1. Metagenoma de la leche humana: de la fisiología a las mastitis

La leche es el único alimento que ingiere el lactante durante los primeros meses de vida, representando una mezcla ideal de nutrientes y compuestos biológicamente activos que resulta ideal para la adaptación a la vida extrauterina. En este sentido, el intestino neonatal depende de estos componentes de la leche para compensar la inmadurez de algunas de sus funciones, como la digestiva, la de barrera, la inmunológica y la neuroendocrina.

La microbiota del calostro y de la leche humana forma parte de esos componentes biológicamente activos y se transfiere verticalmente de la madre al niño, constituyendo una de las primeras fuentes de microorganismos para la colonización inicial del intestino; en consecuencia, la microbiota de la leche humana puede jugar un papel particularmente relevante en el correcto desarrollo del niño (Patel et al. 2017). Sin embargo, en ocasiones la microbiota de la leche humana puede sufrir procesos de disbiosis que conduzcan, en última instancia, al desarrollo de mastitis.

El empleo de técnicas basadas en el cultivo para la caracterización microbiológica de la leche humana es de fácil implementación en los servicios de Microbiología ya que no precisa de equipamiento adicional al empleado en cualquier laboratorio convencional. Además, ofrece la posibilidad de aislar los microorganismos de interés para su posterior caracterización (propiedades probióticas, factores de virulencia, resistencia a antibióticos...). Por otra parte, estas técnicas tienen el inconveniente de que sólo permiten estudiar la fracción cultivable de los microorganismos presentes en una muestra biológica, quedando una gran parte de ellos olvidados. En este sentido, las técnicas independientes de cultivo, aunque tienen ciertas limitaciones, aportan una visión complementaria sobre la composición microbiológica de las muestras biológicas, ya que permiten detectar el material genético perteneciente a microorganismos que, de momento, no se pueden aislar en el laboratorio.

Para profundizar más en el conocimiento de la complejidad de la microbiota de la leche humana, en esta Tesis Doctoral se analizaron muestras de leche procedentes tanto de mujeres sanas como de mujeres con mastitis mediante técnicas independientes de cultivo, empleando la plataforma 454 de pirosecuenciación (Roche).

Aunque previamente se habían publicado resultados del estudio del microbioma de la leche humana (Hunt et al. 2011, Cabrera-Rubio et al. 2012, Ward et al. 2013), se trata del primer análisis metagenómico propiamente dicho que se aplica a este fluido biológico ya que tuvo en cuenta no sólo la presencia de secuencias pertenecientes a bacterias sino también de hongos, protozoos, arqueas, y virus. La proporción ADN humano:ADN



microbiano fue aproximadamente de 9:1 en todas las muestras, incluso en las procedentes de muestras de mastitis. En estas últimas muestras, las bacterias tuvieron recuentos aproximadamente  $2,5 \log_{10}$  más altos que los de las muestras de mujeres sanas aunque la concentración de células epiteliales y leucocitos aumentó de manera directamente proporcional, por lo que se mantuvo la relación 9:1 (Jiménez et al. 2015).

Globalmente, se detectaron secuencias genéticas pertenecientes a los géneros anaerobios facultativos *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Propionibacterium*, además de algunos géneros anaerobios estrictos, como *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* y *Ruminococcus*, corroborando los resultados obtenidos previamente por otros autores (Hunt et al. 2011, Jost et al. 2013).

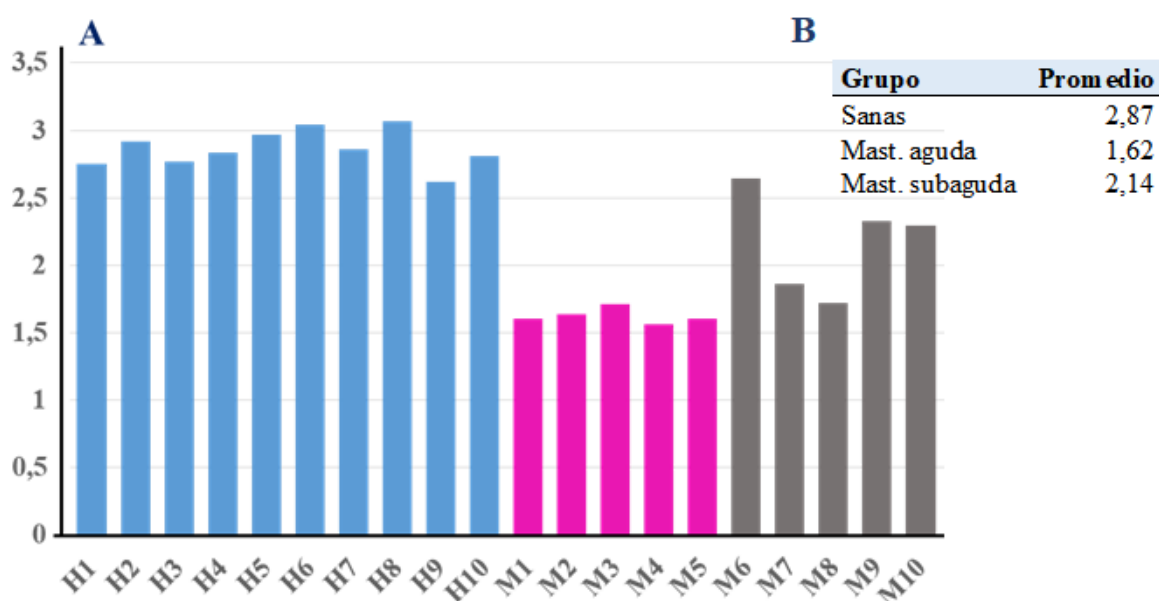
Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto diferencias notables entre las muestras de mujeres sanas y las procedentes de mujeres con mastitis. En primer lugar, las muestras de mujeres sanas se caracterizaron por tener una notable diversidad bacteriana y bastante variabilidad interindividual en relación con las especies bacterianas detectadas. En contraposición, en las muestras de mujeres con mastitis aguda, en las que el agente causal identificado por técnicas de cultivo fue *S. aureus* ( $5,3-6,0 \log_{10}$  ufc/mL), se observó una disminución drástica de la diversidad bacteriana. Además, en estas muestras se registró un claro predominio de secuencias pertenecientes a la especie *S. aureus* (entre el 60,9% y el 67,2% de las secuencias totales). En estas muestras también se detectaron secuencias víricas relacionadas con la patogenicidad de *S. aureus* (Jiménez et al. 2015). La presencia de ciertos fagos es relevante para la patogenicidad de los aislados de *S. aureus* porque el genoma de estos virus puede contener genes que codifican algunos factores de virulencia de esta especie, como los responsables de la síntesis de una gran variedad de toxinas o de los mecanismos para evadir la respuesta del sistema inmunitario del hospedador (Deghorain, Van Melderén 2012, Xia, Wolz 2014).

En las muestras obtenidas de mujeres con mastitis subaguda, donde la especie identificada como agente causal fue *S. epidermidis* ( $5,0-6,0 \log_{10}$  ufc/mL), la disminución de la diversidad bacteriana fue menos notoria que la observada en los casos de mastitis agudas. En las muestras de mastitis subaguda, las secuencias pertenecientes a la clase *Bacilli* (10-35% del total de secuencias) aumentaron con respecto a lo registrado en las muestras de mujeres sanas (0,2-4,3% del total) pero no tanto como en las muestras de mastitis aguda (69-74% del total). Más concretamente, las secuencias correspondientes al género *Staphylococcus* y a la especie *S. epidermidis* representaron entre el 8,3 y el 23,6% y entre el 7,6 y el 21,5%, respectivamente, de las totales obtenidas a partir de las muestras de mastitis subaguda (Jiménez et al. 2015).

Este abordaje ha revelado la gran complejidad del metagenoma de la leche humana, en el que se incluye el genoma de las células humanas (células

epiteliales y células del sistema inmunitario), así como el genoma de arqueas, hongos y protozoos, además del bacteriano y del vírico. Es importante destacar que en ninguna de las 20 muestras de leche analizadas se registró la presencia de secuencias relacionadas con el género *Candida* y que tampoco pudo aislarse este microorganismo utilizando técnicas de cultivo clásicas. Por lo tanto, y a pesar de que el diagnóstico de algunas de las mujeres participantes en el estudio había sido el de candidiasis mamaria o mastitis fúngica, se confirma la ausencia de relación entre *Candida* spp. y las mastitis, tal y como se había señalado anteriormente (Carmichael, Dixon 2002, Hale et al. 2009) y como se ha confirmado recientemente (Jiménez et al. 2017).

La presencia de *S. aureus* se asoció con una drástica reducción en la diversidad microbiana de las muestras M1 a M5, que mostraron el índice de diversidad Shannon-Weaver más bajo entre las muestras incluidas en este trabajo (**Fig. 25**). Este efecto fue menor, pero todavía perceptible en las muestras proporcionadas por las mujeres que sufrían de mastitis subaguda (M6 – M10). La disbiosis asociada con las mastitis se caracterizó por una disminución significativa de las bacterias comensales normales y el aumento de la abundancia de patógenos oportunistas. Un estudio metagenómico posterior de muestras de leche procedentes de mujeres con mastitis observó igualmente que, durante la infección, la disbiosis resultaba en la depleción de las bacterias anaerobias, en el aumento de aerotolerantes oportunistas y en una reducción de la diversidad microbiana (Patel et al. 2017). Estos hallazgos corroboran los resultados de nuestro trabajo. En ese mismo estudio se observó la existencia de rutas funcionales relacionadas con los mecanismos de patogenicidad de las bacterias del género *Staphylococcus* en las muestras de mastitis (Patel et al. 2017).



**Figura 25. Diagrama de barras mostrando el índice de diversidad Shannon-Weaver de cada una de las muestras estudiadas.** A. Las muestras H1 – H10 corresponden a las mujeres que no presentaban síntomas de mastitis; las muestras M1 – M5 proceden de mujeres con mastitis aguda; y las muestras M6 – M10 pertenecen a mujeres con mastitis subaguda. B. Índices de diversidad medios de cada grupo.

Las bacterias Gram-negativas raramente se han aislado de leche humana recogidas manualmente y en condiciones higiénicas, a pesar de que muchas de ellas, como las del género *Pseudomonas* y otros géneros afines, crecen bien en condiciones de laboratorio. De hecho, ninguna bacteria perteneciente a los géneros *Pseudomonas*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Sphingopyxis* o *Sphingobium* pudo ser aislada de las muestras analizadas en esta Tesis Doctoral. La presencia abundante de secuencias de ADN relacionadas con tales géneros en muestras de leche podría tener su origen en los *kits* de extracción de ADN y/o en los reactivos de biología molecular, ya que está bien documentado que pueden contener ADN de tales microorganismos (Salter et al. 2014). Por lo tanto, al estudiar el microbioma de muestras biológicas asociadas a una biomasa microbiana típicamente baja, como es el caso de la leche humana, se deben incluir muestras blancas de control, ya que -de otro modo- es posible introducir errores importantes en las bacterias identificadas, incluyendo algunas que incluso podrían parecer que forman parte del *core* microbiano de la muestra. Teniendo en cuenta ese hecho, el *core* de las muestras de leche humana analizadas en esta Tesis estaba formado por los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Roseburia*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium* y *Ruminococcus*.

Los resultados de este trabajo indican que la leche humana contiene un metagenoma complejo constituido no sólo por el genoma de las bacterias potencialmente presentes sino también por el de las arqueas, virus, hongos y protozoos. Además, muestran que la composición del microbioma de la leche puede diferir notablemente dependiendo del estado de salud de las mujeres reclutadas.

## V.2. Tratamiento de las mastitis con la cepa *L. salivarius* PS2. Búsqueda de marcadores microbiológicos, inmunológicos, bioquímicos y transcriptómicos asociados con su eficacia.

Dentro de la microbiota de la leche humana, existen algunas cepas bacterianas con potencial para ser empleadas como probióticos. Los efectos beneficiosos de los probióticos son específicos dependiendo de la cepa, la diana terapéutica, la dosis y la posología. Por lo tanto, los posibles probióticos para tratar o prevenir una enfermedad concreta deben seleccionarse de manera racional, siguiendo las directrices propuestas conjuntamente por la FAO y la OMS (FAO/WHO 2002).

En relación con las mastitis, la patología aparece por una alteración de la composición normal de la microbiota, permitiendo la proliferación de cepas potencialmente patógenas. El tratamiento convencional de las mastitis suele ser la administración de antibióticos de amplio espectro (cloxacilina, amoxicilina)

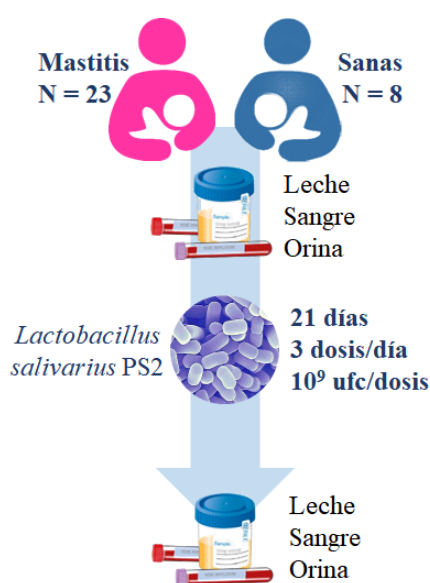
por vía oral. Sin embargo, existe un número creciente de casos causados por cepas resistentes a estos y otros antibióticos y, en consecuencia, el tratamiento o no es eficaz o conduce a cuadros recurrentes. En este contexto, el uso de cepas probióticas aisladas de leche humana y con capacidad para restaurar el equilibrio en la microbiota mamaria y resolver la infección parece una estrategia atractiva como alternativa o complemento a la terapia antibiótica (Fernández et al. 2014b).

Inicialmente, un ensayo piloto mostró el potencial del uso conjunto de *L. salivarius* CECT 5713 y *L. gasseri* CECT 5714, dos cepas aisladas de la leche materna, para el tratamiento de las mastitis estafilocócicas (Jiménez et al., 2008). En ese estudio, 20 mujeres con dicha patología se dividieron al azar en dos grupos. Las del grupo probiótico ingirieron diariamente  $\sim 10 \log_{10}$  ufc de una mezcla equitativa de ambas durante 4 semanas, mientras que las del grupo placebo recibieron únicamente el excipiente en el que se habían vehiculado las cepas. En el día 0, las medias de los recuentos estafilocócicos de ambos grupos fueron similares ( $4,74$  y  $4,81 \log_{10}$  ufc/mL, respectivamente) sin que se pudiera detectar la presencia de lactobacilos en ninguna muestra de ninguno de los grupos. En el día 14, no se observaron signos clínicos de mastitis en las mujeres asignadas al grupo probiótico mientras que persistieron durante todo el período de estudio en las mujeres del grupo placebo. En el día 30, la media del recuento de estafilococos en las muestras de leche del grupo probiótico ( $2,96 \log_{10}$  ufc/mL) fue significativamente menor que el observado en las del grupo placebo ( $4,79 \log_{10}$  ufc/mL), mostrando que el producto probiótico resultaba eficaz para el tratamiento de las mastitis durante la lactancia.

Un estudio posterior evaluó la eficacia de *L. salivarius* CECT 5713 y de otra cepa aislada de leche humana (*L. fermentum* CECT 5716) frente a la misma diana (mastitis), con la novedad de que en este caso su eficacia se comparó con la de la terapia antibiótica convencional (Arroyo et al. 2010). Para ello, un total de 352 mujeres con mastitis se dividieron al azar en tres grupos. Las mujeres de los grupos A ( $n = 124$ ) y B ( $n = 127$ ) ingirieron diariamente  $9 \log_{10}$  ufc de *L. fermentum* CECT 5716 o de *L. salivarius* CECT 5713, respectivamente, durante 3 semanas mientras que las del grupo C ( $n = 101$ ; grupo control) recibieron el tratamiento antibiótico que les habían prescrito en sus respectivos centros de atención primaria. En el día 0, las medias de los recuentos estafilocócicos y o estreptocócicos fueron similares en las muestras de leche de los tres grupos ( $4,35$ - $4,47 \log_{10}$  ufc/mL) y tampoco se pudieron detectar lactobacilos en ninguno de ellos. En el día 21, las medias de los mismos recuentos en las muestras de las mujeres adscritas a uno de los dos grupos probiótico ( $2,61$  y  $2,33 \log_{10}$  ufc/mL) fueron significativamente inferiores a las obtenidas en las del grupo de control ( $3,28 \log_{10}$  ufc/mL). En otras palabras, el tratamiento probiótico condujo a una reducción significativa ( $1,7$ - $2,1 \log_{10}$  ufc/mL) en los recuentos bacterianos de la leche y a una rápida mejoría clínica. El recuento final de estafilococos y/o estreptococos fue de aproximadamente  $2,5 \log_{10}$  ufc/mL, una carga bacteriana aceptable en la leche de mujeres sanas. Sobre la base de los recuentos bacterianos, la

valoración del grado de dolor percibido por las propias mujeres y la evolución clínica, la mejoría de las mujeres adscritas a cualquiera de los dos grupos probióticos fue significativamente mayor que la asociada al empleo de antibióticos, tanto cuantitativamente (número de mujeres que mejoraron su cuadro clínico) como cualitativamente (grado de mejoría). Además, la administración de las cepas probióticas evitó que las mujeres que las recibieron sufrieran los efectos secundarios que, a menudo, se asocian con el tratamiento con antibióticos, tales como infecciones vaginales y episodios recurrentes de mastitis. Más recientemente, un ensayo controlado y aleatorizado mostró que *L. fermentum* CECT 5716 fue capaz de reducir la carga estafilocócica en la leche

de madres que sufrían dolor en el pecho durante la lactancia (Maldonado-Lobón et al. 2015).



**Figura 26. Esquema del estudio**

El estudio incluido en esta Tesis Doctoral tuvo como objetivo la identificación de biomarcadores microbiológicos, bioquímicos e inmunológicos que permitan comprender la base del efecto probiótico. Para ello, mujeres con y sin síntomas de mastitis recibieron tres dosis diarias ( $10^9$  ufc) de *L. salivarius* PS2 durante 21 días (**Fig. 26**). Esta nueva cepa, igualmente aislada de leche humana, fue seleccionada en lugar de *L. salivarius* CECT 5713 por poseer una mayor estabilidad y por carecer de los profagos que contiene la cepa que se había ensayado anteriormente (Langa et al. 2012). Durante el estudio, se recogieron muestras de leche, sangre y orina antes y después de la intervención probiótica, y se sometieron a un amplio espectro de análisis microbiológicos, bioquímicos e inmunológicos. En el grupo de mujeres mastitis, la ingesta de *L. salivarius* PS2 condujo a una notable mejoría clínica. El efecto de *L. salivarius* PS2 en el recuento bacteriano total en leche fue similar a los descritos previamente con *L. salivarius* CECT 5713 (Jiménez et al. 2008b, Arroyo et al. 2010). Tal mejoría estuvo asociada a una reducción en el recuento de bacterias en las muestras de leche, en el recuento de leucocitos en las de leche y sangre, en la concentración de IL-8 en las de leche y en las concentraciones plasmáticas de algunos biomarcadores de estrés oxidativo. Por otra parte, en ese mismo grupo se detectó un aumento en las concentraciones de IgE, IgG<sub>3</sub>, EGF e IL-7 y una modificación en el perfil electrolítico de las muestras de leche (Espinosa-Martos et al. 2016).

Por lo que respecta a la IL-8, algunos estudios enfocados en las mastitis del ganado vacuno han observado que se trata de una citoquina que está

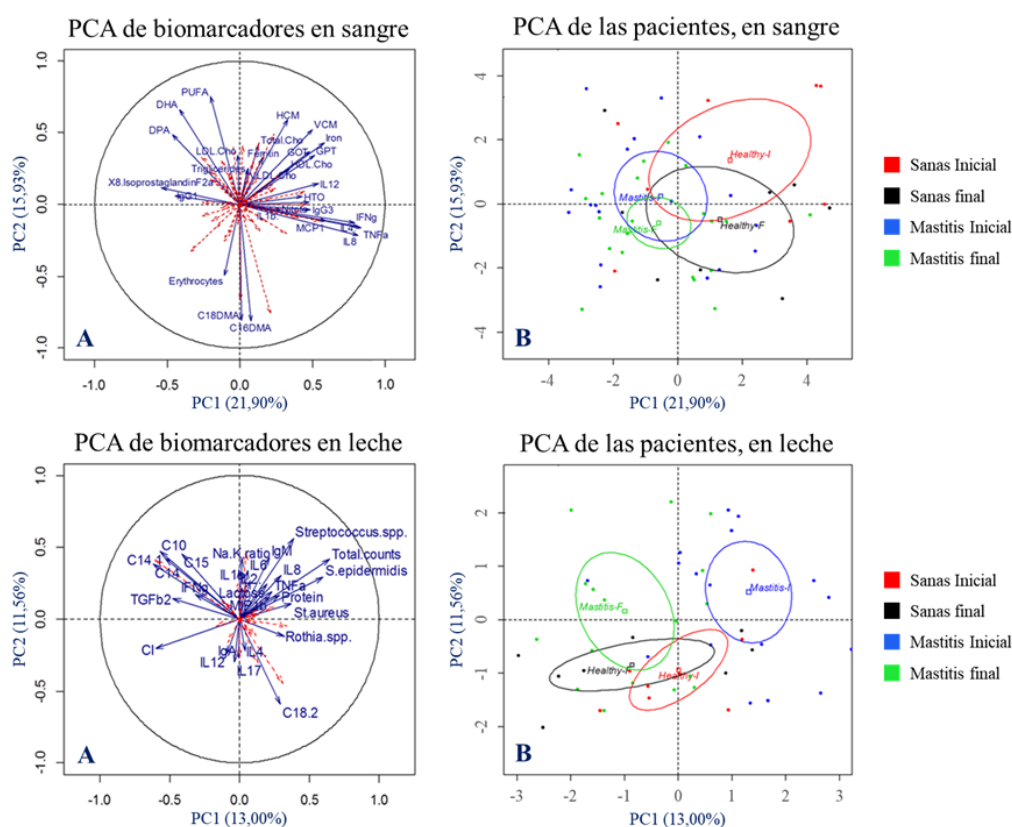
implicada en el reclutamiento temprano de neutrófilos a la glándula mamaria cuando se produce una infección y, en consecuencia, es una de las sustancias responsables del aumento del número de células somáticas en leche, uno de los principales parámetros empleados por el sector lácteo para evaluar la calidad de la leche (Alhussien et al. 2016). Durante las mastitis, tanto bovinas como humanas, la glándula mamaria sufre una infiltración de células del sistema inmunitario, particularmente neutrófilos y linfocitos (Hunt et al. 2013, Alhussien et al. 2016), que posteriormente se secretan con la leche. Por ello, se ha propuesto la utilización del recuento de células somáticas en el diagnóstico de las mastitis humanas (Hunt et al. 2013).

La administración de la cepa probiótica modificó al contenido de proteína total de la leche aunque los valores de este parámetro siempre estuvieron dentro de los límites fisiológicos (Ballard, Morrow 2013). Esta reducción podría deberse a la disminución de proteínas relacionadas con la inflamación en la glándula mamaria. La reducción de los niveles de potasio y los niveles de IgG<sub>3</sub> después del tratamiento con *L. salivarius* PS2 sugieren una mejora en la integridad del epitelio de la glándula mamaria, al restablecerse las uniones estrechas entre sus células. El transporte de IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub> es un mecanismo mediado por receptor que favorece a la subclase IgG<sub>3</sub>, la cual presenta mayor capacidad efectora (Stapleton et al. 2011) y ayuda a reducir la tasa de infección en pacientes inmunodeficientes (Shapiro 2012). Este hecho sugiere que este parámetro puede ser un biomarcador útil para el diagnóstico de la mastitis. Al final del tratamiento con la cepa PS2 también se observó un aumento de la presencia de ácidos grasos de cadena media en las muestras de leche de las mujeres con mastitis. Este cambio parece ligado a la reducción de la concentración de bacterias portadoras de lipasas, como las pertenecientes al género *Staphylococcus* (Rosenstein, Gotz 2000, Vidanarachchi et al. 2015).

En un análisis exploratorio de componentes principales de los parámetros medidos en las muestras biológicas analizadas en este trabajo (**Fig. 27**), no se apreciaron diferencias entre las pacientes del estudio, ni antes ni después de la toma del probiótico, por lo que respecta a las muestras de sangre. Por el contrario, en las muestras de leche, el grupo correspondiente a las mujeres con mastitis al inicio del ensayo está claramente separado del resto de grupos, incluyendo el grupo de las mismas mujeres al final de la intervención con el probiótico, que se agrupa con los dos grupos de mujeres sanas (antes y después de la intervención). Los parámetros que parecen ejercer una mayor influencia en la separación del grupo de las mujeres con mastitis al inicio del ensayo de los demás grupos son los valores de los recuentos bacterianos y de las citoquinas IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ . En consecuencia, las muestras de leche ofrecen una información muy valiosa para valorar el efecto de los probióticos sobre las mastitis mientras que se podría prescindir de las muestras de sangre en futuros ensayos.



En la misma cohorte, la caracterización mediante técnicas de resonancia magnética nuclear del perfil metabólico de las muestras de orina de las mujeres con mastitis mostró un aumento del metabolismo energético (lactato, citrato, formiato, acetato, malonato) y una disminución del catabolismo disminuido de aminoácidos de cadena ramificada (isocaproato e isovalerato) tras el tratamiento con el probiótico (Vázquez-Fresno et al. 2014). Además, la administración del probiótico condujo a la desaparición de las señales correspondientes al ibuprofeno y al acetaminofeno, dos de los fármacos más utilizados para controlar la inflamación y el dolor y que se habían detectado en las muestras recogidas antes del inicio del ensayo. Los cambios en los niveles de acetato y 2-fenilpropionato después de la ingesta del probiótico sugieren un efecto inmunomodulador mientras que el aumento del nivel de malonato indica una estrategia antagonista directa de *L. salivarius* PS2 ya que este catabolito altera el metabolismo estafilocócico y estreptocócico, afectando negativamente a su supervivencia, virulencia y capacidad para la formación de biopelículas. La aparición de lactosa en las muestras iniciales de orina y su desaparición tras la intervención con el probiótico confirman el efecto de la cepa PS2 en la normalización de la permeabilidad del epitelio mamario.



**Figura 27. Análisis de componentes principales de las muestras de leche y sangre recogidas.** A) Mapa bidimensional con aquellas variables que contribuyen de forma significativa a la separación de los distintos estados de salud. Aquellas variables con un  $\cos^2 > 0,2$  se muestran como flechas azules, mientras que las flechas rojas discontinuas representan el posicionamiento en el mapa bidimensional de las variables con una menor contribución. B) Mapa bidimensional de centroides (cuadrados) y elipsoides, obtenidos con una significación del 95%, correspondiente a los distintos grupos del estudio, tanto al inicio como al final de la intervención con el *L. salivarius* PS2, incluidos en el análisis. Todos estos análisis se han realizado con el software estadístico R, versión 3.3.2 (R-project, <http://www.r-project.org>).

Finalmente, un ensayo clínico reciente evaluó el potencial de *L. salivarius* PS2 para prevenir las mastitis cuando se administró por vía oral durante el embarazo a mujeres que ya habían sufrido mastitis después de, al menos, un embarazo previo (Fernández et al. 2016). Un total de 108 mujeres embarazadas fueron divididas aleatoriamente en dos grupos. Las del grupo probiótico (n = 55) ingirieron diariamente  $9 \log_{10}$  ufc de *L. salivarius* PS2 desde la semana 30 de gestación hasta el parto mientras que las del grupo control (n = 53) recibieron un placebo. Todas las mujeres se siguieron durante los primeros 3 meses posparto para evaluar la aparición o no de mastitis. Globalmente, 44 mujeres (59,26%) sufrieron mastitis; sin embargo, el porcentaje de mujeres que sufrieron esta patología fue significativamente menor en el grupo probiótico (25,45%, n = 14) que en el grupo control (56,50%, n = 30). Además, en los casos en los que se produjo una mastitis, los valores de recuentos bacterianos en las muestras de leche del grupo probiótico fueron significativamente menores que los obtenidos en el placebo.

Los mecanismos potenciales por los cuales algunas cepas de lactobacilos son capaces de controlar los agentes causantes de mastitis han sido revisados por Fernández et al. (2014) (Fernández et al. 2014b). La ingesta de cepas probióticas durante el embarazo y/o la lactancia aumenta los niveles de IgA y TGF- $\beta_2$  en la leche materna (Rautava et al. 2002, Prescott et al. 2008, Nikniaz et al. 2013). Este hecho puede contribuir al control del crecimiento local de las bacterias causantes de mastitis, limitando al mismo tiempo su capacidad de acceder o dañar el epitelio mamario. Por el contrario, en otro ensayo en el que se administró una cepa de *Lactobacillus reuteri* a mujeres embarazadas, se redujo el nivel de TGF- $\beta_2$  en el calostro (Böttcher et al 2008). Este resultado aparentemente contradictorio puede deberse a las diferentes respuestas mamarias inducidas por diferentes cepas bacterianas y puede explicar por qué muchas cepas probióticas no son adecuadas para la prevención y el tratamiento de las mastitis. En nuestro estudio, el aumento de la concentración de TGF- $\beta_2$  fue particularmente marcado en el grupo de mujeres sanas tras el tratamiento con *L. salivarius* PS2. Este resultado sugiere que la administración de esta cepa durante el embarazo y la lactancia puede resultar beneficiosa para la pareja madre-hijo independientemente de que la mujer sufra mastitis o no. El TGF- $\beta_2$  es un factor clave en la inmunorregulación mamaria (Smith et al. 2000, Veldhoen et al. 2006, Nguyen et al. 2014), promoviendo la producción de IgA, la inducción de mecanismos de tolerancia oral en los niños (Stavnezer 1995, Oddy, Rosales 2010), y la regulación de las respuestas inmunitarias en el intestino infantil tras la ingesta de alimentos (Penttilä 2010b, Faria, Weiner 2006). Varios estudios clínicos han demostrado una asociación directa entre una mayor concentración de TGF- $\beta_2$  en leche y una disminución del riesgo de enfermedades neonatales, fundamentalmente las del tracto respiratorio y las de base alérgica (Kalliomaki et al. 1999, Oddy et al. 2003, Penttilä 2006, Verhasselt 2010). La presencia de

TGF- $\beta$  atenúa la respuesta inflamatoria a las citoquina IL-1 $\beta$  y promueve la inducción tolerancia antigénica durante la colonización de intestino neonatal (Hill, Newburg 2015).

Por otra parte, los procesos de exclusión competitiva y la producción de sustancias antimicrobianas (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y/o bacteriocinas) también pueden explicar el control de las bacterias causantes de mastitis por parte de ciertas cepas de lactobacilos (Beasley, Saris 2004, Martín et al. 2005, Martín et al. 2006, Olivares et al. 2006). Esto implicaría que la cepa en cuestión debería ser capaz de alcanzar la glándula mamaria tras su ingesta oral a través de una ruta endógena (la llamada vía entero-mamaria), que parece implicar interacciones complejas entre las bacterias, las células del epitelio intestinal y las células asociadas al tejido linfoide intestinal de la madre (Pérez et al. 2007, Rodríguez 2014). Este tema se discutirá con más detalle posteriormente.

En este mismo ensayo clínico se estudió la expresión génica por parte de las células presentes en las muestras de leche humana. El análisis de los genes expresados por una célula o grupo de células proporciona información muy valiosa sobre su función en distintas condiciones ambientales o fisiopatológicas. Los genes que se activan en las células del epitelio mamario humano son diferentes dependiendo de la fase de lactancia, ya sea para optimizar la producción de leche o para iniciar el proceso de involución de la glándula mamaria durante el destete (Sharp et al. 2016, Bardanzellu et al. 2017). El estudio transcriptómico de las células de la leche tiene la ventaja de que se trata de un tipo de muestra biológica que es fácil de obtener empleando procedimientos no invasivos.

Las mastitis representan una de las enfermedades más frecuentes y costosas para el sector lácteo ganadero. La existencia de una base genética para las respuestas del huésped a las infecciones mamarias bacterianas está bien documentada en los rumiantes domésticos (Swanson et al. 2009, de Greeff et al. 2013, Sipka et al. 2014, Sun et al. 2015), aunque los mecanismos y los genes concretos implicados siguen siendo, en gran medida, desconocidos. No obstante, dada la alta incidencia y relevancia económica de esta patología, se han llevado a cabo varios estudios transcriptómicos a partir de la leche y el tejido mamario bovino. La mayor parte de estos trabajos han tratado de conocer la respuesta de la glándula mamaria frente a una infección artificial con *S. aureus*, *S. epidermidis* o *Escherichia coli*, centrándose en genes que se sabe que están relacionados con los procesos de inflamación y que, efectivamente, se sobreexpresaban tras la inoculación de las bacterias (Bonnetfont et al. 2011, Schukken et al. 2011, Cremonesi et al. 2012, Wellnitz, Bruckmaier 2012, Fu et al. 2013, Brenaut et al. 2014, Mazzilli et al. 2015).

Por lo que respecta a las mastitis humanas, sólo existe un estudio previo en el que se haya analizado la expresión de genes en la leche pero el

**Tabla 6. Rutas involucradas cuando la selección de genes implicados comprende únicamente el  $\text{fold-change} > 0 < 2$ .**

Nombre de la ruta	P-valor	Identificador de la ruta
Infección por <i>Staphylococcus aureus</i>	0,000	kegg_pathway_218
Leishmaniasis	0,000	kegg_pathway_4
Diferenciación de osteoclastos	0,000	kegg_pathway_17
Artritis reumatoide	0,000	kegg_pathway_170
Cascadas de complemento y coagulación	0,000	kegg_pathway_23
Enfermedad de injerto contra huésped	0,000	kegg_pathway_173
Interacción citoquina-receptor de citoquinas	0,000	kegg_pathway_79
Fagosoma	0,000	kegg_pathway_47
Tuberculosis	0,000	kegg_pathway_217
Pertussis	0,000	kegg_pathway_273
Vía de señalización de quimioquinas	0,000	kegg_pathway_255
Lupus eritematoso sistémico	0,000	kegg_pathway_144
Citotoxicidad mediada por células NK	0,000	kegg_pathway_177
Moléculas de adhesión celular	0,000	kegg_pathway_117
Diabetes mellitus tipo I	0,000	kegg_pathway_123
Malaria	0,001	kegg_pathway_119
Vía de señalización del TNF	0,001	kegg_pathway_243
Absorción de minerales	0,001	kegg_pathway_126
Rechazo de aloinjerto	0,001	kegg_pathway_264
Procesamiento y presentación de antígenos	0,002	kegg_pathway_38
Miocarditis viral	0,002	kegg_pathway_168
Influenza A	0,002	kegg_pathway_104
Infección por herpes simple	0,003	kegg_pathway_129
Amebiasis	0,003	kegg_pathway_214
Asma	0,004	kegg_pathway_160
Enfermedad tiroidea autoinmune	0,006	kegg_pathway_136
Legionelosis	0,007	kegg_pathway_39
Enfermedad de Chagas (trpanosomiasis americana)	0,008	kegg_pathway_228
Enfermedades priónicas	0,009	kegg_pathway_105
Vía de señalización del receptor Toll-like	0,010	kegg_pathway_56
Infección por HTLV-I	0,013	kegg_pathway_190
Linaje de células hematopoyéticas	0,014	kegg_pathway_159
Enfermedad inflamatoria intestinal	0,016	kegg_pathway_22
Fagocitosis mediada por el receptor para Fc gamma	0,016	kegg_pathway_183
Desregulación transcripcional en el cáncer	0,019	kegg_pathway_34
Señalización de células epiteliales por <i>Helicobacter pylori</i>	0,019	kegg_pathway_186
Cascada inmunitaria intestinal para producción de IgA	0,020	kegg_pathway_197
Vía de señalización del receptor tipo NOD	0,038	kegg_pathway_91
Tripanosomiasis africana	0,040	kegg_pathway_244
Infección por <i>Salmonella</i>	0,043	kegg_pathway_71
Metabolismo de glicina, serina y treonina	0,049	kegg_pathway_198

conocimiento generado fue muy limitado ya que incluía una única muestra procedente de una mujer con mastitis (Sharp et al. 2016). El análisis funcional de esa muestra mostró un aumento en la respuesta inflamatoria y la función asociada con la señalización celular, la muerte y la supervivencia en comparación con muestras de leche de mujeres sin mastitis. En cualquier caso, la respuesta del huésped humano parece implicar la expresión de una serie de genes antimicrobianos, antiinflamatorios y de respuesta inmunitaria que actúan de forma coordinada frente a la infección bacteriana (Sharp et al. 2016). Aparte de la limitación inherente al limitadísimo tamaño muestral, estos autores no investigaron el proceso de recuperación de la glándula mamaria tras esta patología. En este sentido, nuestro ensayo ofrece resultados novedosos en el campo de la aplicación de las técnicas -ómicas al estudio de la glándula mamaria y de los mecanismos de acción de los probióticos empleados en el tratamiento de esta infección.

Para este estudio, se extrajo el ARN de muestras de leche de un subgrupo de las mujeres del estudio (5 mujeres del grupo de mastitis y 3 del grupo de sanas) seleccionadas al azar, y se realizó un análisis transcriptómico mediante la tecnología de micromatrices de ADN o *microarrays*, con la intención de estudiar la respuesta de las células somáticas de la leche humana en el transcurso de la intervención con el probiótico *L. salivarius* PS2. El empleo de *microarrays* permite examinar simultáneamente un gran número de genes y por tanto, obtener una visión global de lo que están expresando las células en ese momento. En consecuencia, y al contrario que otros estudios que se han centrado en la expresión de familias de genes específicas, se trata de un ensayo exploratorio, en busca de posibles genes que puedan ser utilizados en el futuro como marcadores para el diagnóstico y pronóstico de la mastitis en humanos o para explicar los mecanismos de acción de la cepa evaluada frente a esta infección.

El estudio presentado en esta Tesis Doctoral es el primero en evaluar los cambios en la expresión génica de las células somáticas de la leche humana de mujeres que sufren mastitis y que han recibido un tratamiento probiótico. Al inicio del estudio, se observó la sobreexpresión de genes relacionados con los procesos inflamatorios y de apoptosis mientras que al final del mismo se sobreexpresaban aquellos asociados con el estado fisiológico normal de este tipo de células. Cuando el análisis funcional de los datos obtenidos se realiza sin tener en cuenta el valor *P* y colocando el valor de corte del parámetro “*fold-change*” en 2, la primera ruta que aparece es la de “*infección de Staphylococcus aureus*”, sugiriendo que existe una respuesta génica específica frente a la infección por este microorganismo, uno de los principales agentes etiológicos de las mastitis humanas (**Tabla 6**).

La ingesta de probióticos por parte de mujeres sin mastitis también provocó un cambio significativo en la expresión de algunas familias de genes. El cambio observado en este grupo entre los dos tiempos del estudio (antes y después del tratamiento con el probiótico) es muy claro, en especial en la

sobreexpresión de genes relacionados con el TGF- $\beta_2$ . Este hecho se corresponde con el aumento de las cantidades de TGF- $\beta_2$  observadas cuando se analizó el perfil inmunitario secretor en la leche de este mismo grupo de mujeres (Espinosa-Martos et al. 2016), tal y como se discutió anteriormente.

En conclusión, el presente estudio ha permitido identificar diversos biomarcadores microbiológicos, bioquímicos e inmunológicos que serán muy útiles a la hora de evaluar los efectos de la cepa *L. salivarius* PS2 en una cohorte más amplia.

### V.3. Efecto de la translocación bacteriana durante la gestación en la composición de la microbiota de la leche humana

En los últimos años, algunos estudios dependientes de cultivo han revelado que la leche de mujeres sanas contiene bacterias, incluyendo estafilococos, estreptococos, corinebacterias, bacterias lácticas, propionibacterias y bifidobacterias (Fernández et al. 2013b). La aplicación de técnicas independientes del cultivo, incluyendo la microbiómica y la metagenómica, ha confirmado la presencia de ADN de estos y otros géneros bacterianos (Martín et al. 2007b, Hunt et al. 2011, Cabrera-Rubio et al. 2012, Jost et al. 2013, Jost et al. 2014, Jiménez et al. 2015). Por lo tanto, este fluido biológico es una fuente continua de bacterias vivas para el tracto gastrointestinal infantil y, de hecho, diferentes estudios han demostrado que existe una transferencia madre-hijo de cepas bacterianas a través de la lactancia (Albesharat et al. 2011, Martín et al. 2012b, Jost et al. 2014, Milani et al. 2015).

Tradicionalmente, cualquier célula bacteriana presente en la leche humana era considerada como el resultado de una contaminación que se originaba o bien a partir de la cavidad oral del lactante o bien a partir de la piel de la madre. Sin embargo, la comparación entre las comunidades bacterianas detectadas en la leche y las encontradas en la piel del pecho o en la boca del niño han revelado que existen algunos filotipos compartidos entre los distintos nichos pero que existen también grandes diferencias entre ellos (Hunt et al. 2011, Cabrera-Rubio et al. 2012, Jost et al. 2013, Jiménez et al. 2015).

Por otra parte, la detección de células bacterianas vivas y/o de ADN correspondiente a especies anaerobias que están generalmente relacionadas con el ecosistema intestinal y que no pueden sobrevivir en lugares aeróbicos, como la piel, ha alimentado un debate científico sobre el origen de las bacterias asociadas con la leche y ha servido para hipotetizar que algunas de las bacterias de la leche humana pueden originarse en el tracto digestivo materno (boca, tracto gastrointestinal) y llegar a la glándula mamaria a través de una ruta endógena (Rodríguez 2014) (**Fig. 28**). En este sentido, ya se ha documentado que muestras de heces y leche maternas y de heces neonatales procedentes del mismo par madre-niño comparten ADN de algunos géneros anaeróbicos estrictos, como



*Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Coprococcus*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Subdoligranulum* y algunos miembros de la clase *Clostridia* (*Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella* y *Veillonella*) (Pérez et al. 2007, Albesharat et al. 2011, Martín et al. 2012b, Jost et al. 2013).

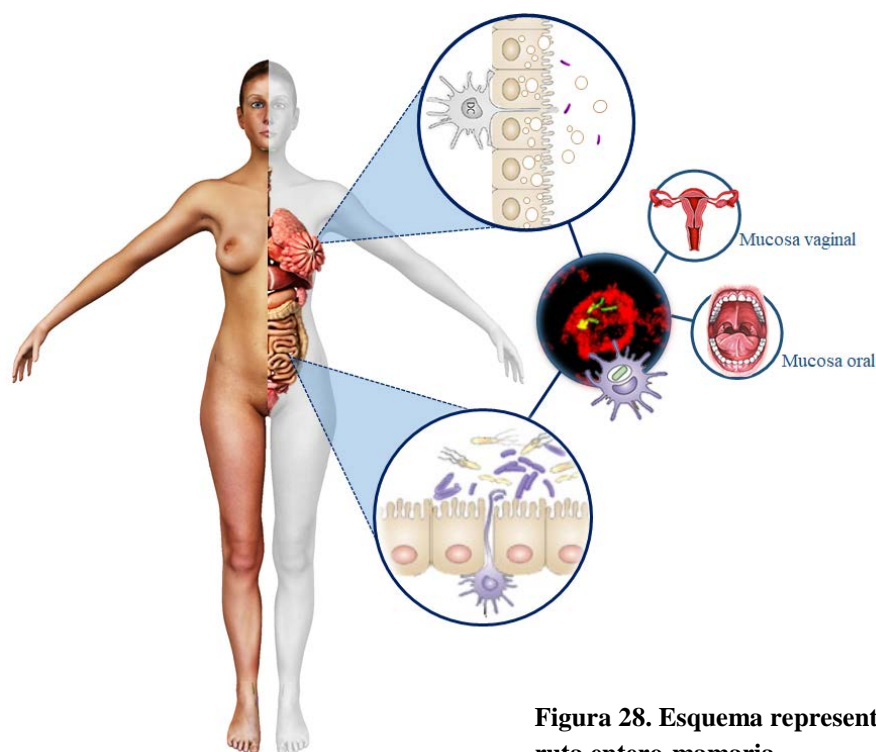
En este contexto, y una vez demostrada la eficacia de algunas cepas de lactobacilos frente a las mastitis así como la presencia de las cepas administradas oralmente en la leche de algunas mujeres participantes en dichos ensayos (Arroyo et al. 2010, Jiménez et al. 2008b, Fernández et al. 2016), esta Tesis Doctoral investigó la posibilidad de que la administración oral de la cepa ensayada (*L. salivarius* PS2) condujese a su translocación *in vivo* durante la gestación, transfiriéndose desde el aparato digestivo hasta la glándula mamaria. Para poner de manifiesto esta posible ruta entero-mamaria, se recurrió al marcaje genético y fenotípico de las cepas *Lactococcus lactis* MG1614 y *L. salivarius* PS2, y a su posterior administración por vía oral a ratonas Balb/c gestantes.

La modificación de ambas cepas supuso la introducción de los genes pertenecientes al operón *lux* y la detección de la bioluminiscencia resultante. Este método de marcaje constituye una excelente herramienta para la detección *in vivo* de bacterias específicas en modelos animales (Greer, Szalay 2002). Sus ventajas incluyen: (a) una detección muy sensible y rápida de la actividad luciferasa, (b) una respuesta luminiscente que es linealmente dependiente de la cantidad de luciferasa, y (c) la posibilidad de utilizar técnicas no invasivas en tiempo real cuando se combina con cámaras CCD de baja luminosidad (Greer, Szalay 2002, Gahan 2012).

El plásmido recombinante pMG36e::*luxABCDE* (con el operón *lux* completo) fue introducido con éxito en células de *L. lactis* MG1614 pero no en las de *L. salivarius* PS2. El gran tamaño del plásmido (> 10 kb) y el hecho de que *L. salivarius* PS2 sea una cepa silvestre pueden explicar la incapacidad para obtener transformantes. Afortunadamente, las células de *L. salivarius* PS2 se pudieron transformar con el plásmido pMG36e::*luxAB*, más pequeño ya que carece de los genes que codifican el sustrato de la reacción. En ausencia de los genes *luxCDE*, la bioluminiscencia de la cepa marcada se puede seguir detectando siempre que se añada el sustrato (D-luciferina) al medio estudiado.

Ambas cepas pudieron aislarse (y los genes *lux* ser detectados mediante PCR) de muestras de leche o de biopsias de glándula mamaria tras su administración oral a las ratonas. Se puede argumentar que su presencia en la leche podría ser el resultado de una contaminación fecal superficial; sin embargo, tal ruta difícilmente puede explicar su aislamiento y detección a partir de biopsias mamarias profundas. En un trabajo previo, la administración oral de *L. salivarius* PS2 a mujeres embarazadas llevó a la presencia de la cepa en la leche de algunas de las mujeres después del parto (Fernández et al. 2016). Hay que señalar que, en contraste con las ratonas, la contaminación fecal de la leche humana es altamente improbable y, de hecho, las enterobacterias están

generalmente ausentes en muestras de leche recogidas de mujeres sanas en condiciones higiénicas (Mediano et al. 2017). Nuestros resultados refuerzan la hipótesis de que, al menos, algunos miembros de la microbiota de la leche pueden proceder del tracto digestivo de la madre.



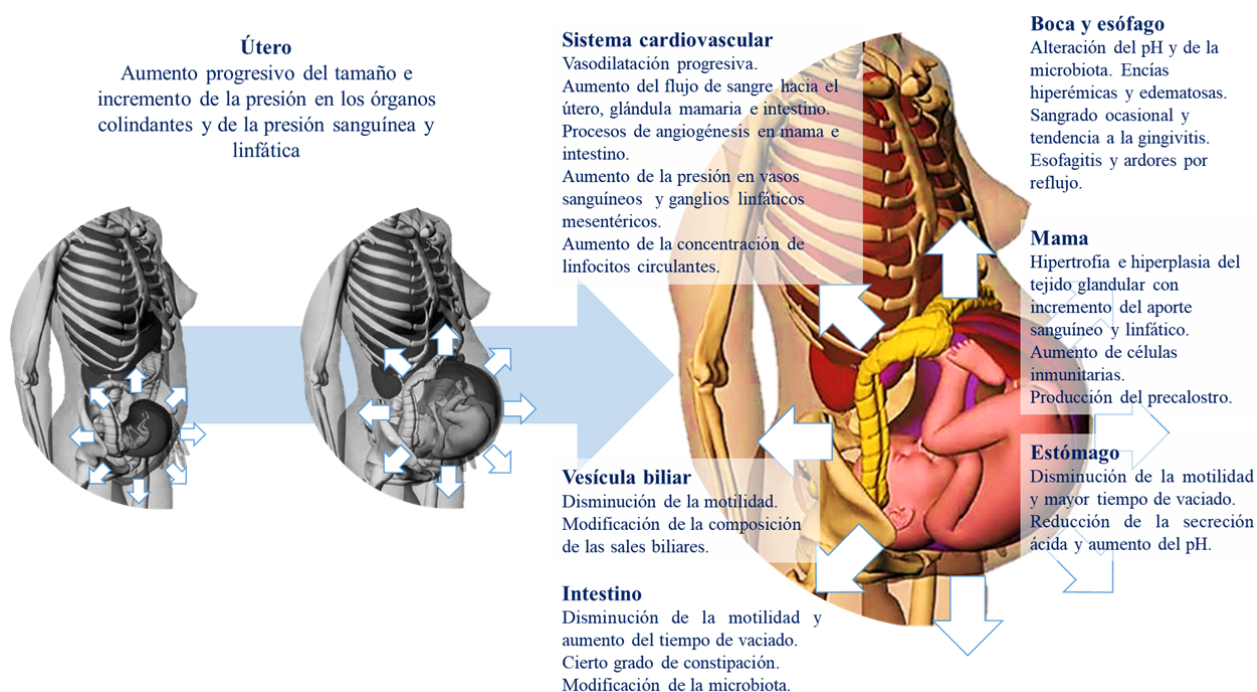
**Figura 28. Esquema representando la ruta entero-mamaria.**

Un inconveniente importante de los estudios independientes de cultivo enfocados en la demostración de la transmisión de bacterias entre personas es la ausencia de información sobre la viabilidad de las poblaciones detectadas y la falta de capacidad de discriminación a nivel de cepa, lo cual es absolutamente necesario para demostrar que la misma bacteria es compartida entre la madre y el lactante (Jost et al. 2013). Este hecho es particularmente relevante en el caso de aquellas especies anaerobias estrictas que actualmente no se pueden cultivar en el laboratorio. Sin embargo, ya se ha documentado la transferencia de cepas de bifidobacterias, lactobacilos y/u otras bacterias desde el tracto gastrointestinal materno hasta el intestino neonatal (Makino et al. 2011, Takahashi et al. 2010, Kulagina et al. 2010), desde el tracto gastrointestinal materno a la leche de la madre (Fernández et al. 2016, Arroyo et al. 2010, Abrahamsson et al. 2009, Martín et al. 2006), de la leche materna al tracto gastrointestinal neonatal (Martín et al. 2012b, Martín et al. 2003), y del tracto gastrointestinal materno a la leche y el tracto gastrointestinal del lactante (Jost et al. 2014, Albesharat et al. 2011) mediante el empleo de técnicas dependientes de cultivo y el genotipado de los aislados obtenidos a partir de las distintas muestras analizadas. Estos estudios refuerzan la hipótesis de que al menos algunas bacterias, incluyendo anaerobios

obligatorios, pueden ser transferidas verticalmente de la madre al lactante a través de la leche materna.

El término translocación bacteriana se define como el paso de bacterias viables desde el tracto gastrointestinal hacia la lámina propia y, posteriormente, hacia los ganglios linfáticos mesentéricos y otros órganos extraintestinales, como el bazo, el hígado, los riñones, la cavidad peritoneal o el torrente sanguíneo. Tradicionalmente, la translocación de las bacterias intestinales se había asociado con condiciones patológicas y, por lo tanto, se había estudiado principalmente en pacientes en los que las bacterias patógenas se habían diseminado causando sepsis, insuficiencia en diversos órganos e, incluso en algunas ocasiones, la muerte de las personas afectadas (Berg, Garlington 1979, Lichtman 2001, Balzan et al. 2007). Sin embargo, se sabe que existe un proceso de translocación bacteriana fisiológica en individuos sanos, sin efectos perjudiciales para el huésped (Yamazaki et al. 1985, Moore et al. 1992, Sedman et al. 1994, Berg 1995, Lichtman 2001, Rodríguez et al. 2001, Liong 2008). De hecho, se ha sugerido que la translocación bacteriana a los tejidos extraintestinales es un evento fisiológico beneficioso en niños sanos, ya que puede estar asociado con la maduración y aprendizaje inicial del sistema inmunitario neonatal (MacFie 2004, Balzan et al. 2007, Pérez et al. 2007).

Durante el embarazo y la lactancia se producen muchos cambios anatómicos y fisiológicos transitorios que implican "virtualmente" a todos los sistemas, incluyendo el cardiovascular, el respiratorio, el genitourinario y el digestivo, y que proporcionan un marco adecuado para el desarrollo del feto y del recién nacido (Fig. 29). Tales adaptaciones pueden favorecer un aumento de la translocación bacteriana durante el embarazo y la lactancia.



**Figura 29. Cambios fisiológicos durante el embarazo.** Modificado de Rodríguez 2015.

Los cambios en el sistema cardiovascular se caracterizan por una vasodilatación progresiva y generalizada y la alteración de diversos parámetros, incluyendo el volumen sanguíneo, el volumen sistólico, el gasto cardíaco, la frecuencia cardíaca, el flujo sanguíneo regional a varios órganos (útero, riñones, tracto gastrointestinal, piel, glándula mamaria...), el proceso de angiogénesis y la concentración sanguínea de algunos factores de coagulación y de los leucocitos (Mira, Rodríguez 2017). La acción hormonal también induce cambios orales relevantes durante el embarazo, afectando a su pH y microbiota; las encías se vuelven hiperémicas y edematosas y, por consiguiente, tienden a sangrar. La transferencia de algunas especies bacterianas y/o de sus metabolitos al torrente sanguíneo se ha asociado con el inicio del parto prematuro (Straka 2011).

Los principales efectos de la gestación en el sistema gastrointestinal están asociados con el desplazamiento de los órganos abdominales por el crecimiento progresivo del útero y también por una disminución de la motilidad, presumiblemente debido al efecto de la progesterona en la contractilidad del músculo liso. Esto provoca un aumento en el tiempo de vaciado gástrico y una disminución de la secreción gástrica, que origina un pH gástrico más básico. Además, los vasos sanguíneos mesentéricos maternos están expuestos a estrógenos y a una presión fetal creciente, lo que conduce a una congestión vascular transitoria y al estancamiento de sangre. Asimismo, una de las adaptaciones más dramáticas del cuerpo durante el final del embarazo y la lactancia es el gran aumento en el tamaño y complejidad del intestino materno (Hammond 1997). Globalmente, el tracto digestivo se caracteriza en ese periodo por un debilitamiento de las barreras frente al crecimiento bacteriano, un aumento de la permeabilidad y una reducción del peristaltismo, tres factores que están estrechamente asociados a la translocación bacteriana (Sedman et al. 1994). Paralelamente, los cambios anatómicos y fisiológicos que experimenta el ecosistema mamario, incluyendo conductos, areola y pezones, facilitan la formación de una microbiota mamaria específica (Beischer et al. 1997, Fernández et al. 2013a).

La translocación bacteriana durante el periodo final de la gestación ya ha sido descrita en ratonas, en las que la inoculación oral de una cepa marcada genéticamente condujo a su aislamiento y detección por PCR en el líquido amniótico y la leche (Jiménez et al. 2005). Un estudio posterior confirmó la translocación bacteriana desde el intestino a los ganglios linfáticos mesentéricos y a las glándulas mamarias en ratonas gestantes y lactantes (Pérez et al. 2007). Las bacterias se observaron histológicamente en la cúpula subepitelial y en las regiones intercelulares de las placas de Peyer, en la lámina propia del intestino delgado y en el tejido glandular mamario. Las placas de Peyer de estas ratonas eran macroscópicamente más grandes y tenían una cúpula subepitelial más prominente que las de los animales control. En el mismo estudio se tiñeron las células inmunitarias mononucleares presentes en

las muestras de leche y sangre periférica de varias mujeres sanas con naranja de acridina, lo que permitió la identificación de bacterias en estrecha asociación con dichas células (Pérez et al. 2007).

En consecuencia, se ha sugerido que ciertas bacterias seleccionadas de la microbiota digestiva materna pueden acceder a las glándulas mamarias a través de una vía oro-entero-mamaria (Rodríguez 2014, Mira, Rodríguez 2017). Estudios previos han indicado que ciertas bacterias del tracto digestivo materno pueden propagarse a localizaciones extra-digestivas en huéspedes sanos (Ouweland et al. 2001, Vankerckhoven et al. 2004, Dasanayake et al. 2005, Jiménez et al. 2005). Aunque se trata de un tema controvertido en la actualidad, algunos estudios han ofrecido una base científica para dicha translocación fisiológica (revisado en Rodríguez 2014). El mecanismo implicaría a las células dendríticas y células CD18<sup>+</sup> (Vázquez-Torres et al. 1999, Rescigno et al. 2001, Macpherson, Uhr 2004), que serían capaces de captar bacterias no patógenas viables presentes en el lumen del intestino y, posteriormente, llevarlas a otros lugares, incluyendo la glándula mamaria lactante (Roitt, Delves 2001). Cabe recordar que existe un intenso flujo de células inmunitarias intestinales a las glándulas mamarias durante el embarazo y la lactancia (Bertotto et al. 1991, Newburg 2005).

En la actualidad, está ampliamente aceptado que existen microorganismos en órganos y tejidos de los que antes se pensaba que eran estériles, incluyendo tumores (Cronin et al. 2010). La administración oral de una cepa de *Bifidobacterium breve*, que contenía un plásmido con el operón *lux*, a ratones con tumores subcutáneos condujo a su presencia en los tumores durante más de 2 semanas y a niveles similares a los observados tras su administración intravenosa (Cronin et al. 2010). De forma similar, otra cepa probiótica (*E. coli* Nissle 1917) fue capaz de colonizar el tejido tumoral después de su administración oral a roedores con metástasis hepáticas pero no colonizó ni el tejido hepático fibrótico ni ningún otro órgano (Danino et al. 2015). Los autores sugirieron que la administración oral podría conducir a la colonización preferencial de los tumores hepáticos a través de la vena porta.

Este fenómeno se ha atribuido, al menos, a tres factores diferentes: (a) la supresión de la vigilancia inmunitaria dentro del tumor; (b) la vascularización tumoral; y (c) la mayor disponibilidad de nutrientes en el núcleo necrótico del tumor (Li et al. 2003, Yu et al. 2004, Zhao et al. 2005). En otras palabras, la entrada, supervivencia y replicación de bacterias en los tumores parece depender de su gran vascularización y del estado inmunitario asociado a estas estructuras, factores que pueden proporcionar un microambiente adecuado para un pequeño espectro de especies bacterianas (Yu et al. 2004). El medio rico en nutrientes también puede desempeñar un papel importante ya que los tejidos tumores son adecuados para el crecimiento de algunas cepas de *S. typhimurium* (Zhao et al. 2005, Zhao et al. 2006, Nagakura et al. 2009). Es importante destacar que estos

mismos factores también están presentes en las glándulas mamarias durante y al final del embarazo y pueden explicar el tropismo selectivo que la glándula mamaria parece ejercer sobre algunas especies bacterianas maternas durante dicha etapa: (a) existe un estado fisiológico de inmunodepresión con el fin de tolerar el feto; (b) como se ha indicado anteriormente, existe un formidable proceso de angiogénesis; y (c) el precalostro comienza a llenar el conducto mamario durante el último tercio del embarazo proporcionando un rico ambiente nutritivo para las bacterias, facilitando así su crecimiento.

Se requieren más estudios para elucidar los mecanismos por los cuales algunas cepas bacterianas pueden translocar fisiológicamente en ciertos huéspedes o etapas de la vida. La existencia de tales vías bacterianas oro-entero-mamarias proporcionaría nuevas oportunidades para manipular la microbiota materno-fetal alterada, reduciendo el riesgo de parto prematuro, mastitis o de ciertas enfermedades infantiles.

#### V.4. Modulación de la microbiota de los niños prematuros mediante el empleo de cepas probióticas aisladas de la leche humana

En esta Tesis, se administraron dos cepas probióticas aisladas de leche humana (*B. breve* PS12929 y *L. salivarius* PS12934) a cinco niños prematuros de peso muy bajo (< 1500g) o extremadamente bajo (< 1000g) al nacer durante sus primeras semanas de vida y se estudió su efecto sobre la composición bacteriana de las muestras fecales (meconio y heces). Paralelamente, se determinó la concentración de una amplia gama de inmunocompuestos (citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, inmunoglobulinas) en muestras de plasma, meconio y heces con el objetivo de poder determinar si se producían cambios a lo largo del tratamiento y, en tal caso, su posible relación con la colonización bacteriana y/o las características clínicas de los niños.

Los resultados obtenidos indican que la administración de *B. breve* PS12929 y *L. salivarius* PS12934 consiguió aumentar los niveles de lactobacilos y bifidobacterias en las heces de los niños tratados. De hecho, *L. salivarius* PS12934 pudo ser aislado a partir de las muestras desde el séptimo día de la intervención y su presencia se mantuvo constante durante todo el estudio. También se pudo aislar la cepa *B. breve* PS12929 en algunas muestras a partir de los 14 días y, desde entonces, su presencia fue cada vez mayor. El aumento en la frecuencia y concentración de lactobacilos y bifidobacterias en las heces analizadas constituye un resultado muy positivo de la Tesis ya que el patrón de colonización intestinal en esta población específica generalmente se caracteriza por un predominio de patógenos oportunistas y una gran reducción, e incluso ausencia, de lactobacilos y bifidobacterias (Mshvildadze et al. 2010, Madan et al. 2012, Moles et al. 2013). Además, la administración de las dos cepas no sólo



conllevo un aumento de las mismas sino que contribuyó a una mayor diversidad bacteriana global en el intestino de los niños tratados. De hecho, los valores de diversidad de sus heces fueron más altos que los descritos previamente en una cohorte similar a la que no se suministró probióticos (Moles et al. 2013). El uso intensivo de antibióticos en las UCIN suele provocar una reducción importante en la diversidad microbiana y un aumento de clones de alto riesgo (Greenwood et al. 2014); sin embargo, la administración de las cepas probióticas en este estudio parecía compensar, al menos parcialmente, estos efectos adversos de los antibióticos.

Hasta la fecha, ha habido una ausencia casi total de estudios enfocados en los parámetros inmunológicos fecales de los recién nacidos prematuros. Como consecuencia, no hay valores de referencia para esta población y, por lo tanto, esta parte de la Tesis puede constituir un punto de partida para futuras investigaciones, a pesar del bajo número de niños evaluados. En contraste, sí existen algunos estudios (aunque muy escasos) centrados en el análisis de diversos compuestos inmunitarios en muestras de sangre de prematuros. Globalmente, los resultados de tales investigaciones demuestran que existen diferencias en los perfiles inmunológicos sanguíneos en función de la edad gestacional del niño (Blanco-Quiros et al. 2000, Matoba et al. 2009, Lusiyati et al. 2013). En este sentido, los niveles séricos de IL-8 detectados en recién nacidos a término (Hodge et al. 2004) fueron inferiores a los obtenidos en esta Tesis mientras que los de IL-4 e IL-6 fueron similares; sin embargo, los valores para los restantes parámetros inmunológicos fueron siempre más altos en los niños nacidos a término, un hecho que ilustra la inmadurez inmunológica de los prematuros. Del mismo modo, las concentraciones de IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y MCP-1 fueron más bajas en prematuros nacidos a las 30-32 semanas de gestación que en los nacidos después de 36 semanas, lo que indica una menor estimulación o activación de las células Th1 y de las células presentadoras de antígenos a medida que disminuye la edad gestacional del neonato (Lusiyati et al. 2013). En esta Tesis, las concentraciones de las quimioquinas IL-8 y MCP-1 y las de las citoquinas IL-4, IL-10 e IL-13, que están relacionadas con los procesos antiinflamatorios, fueron mayores que las descritas anteriormente para neonatos prematuros nacidos a las 30-32 semanas y similares a las halladas en lactantes de mayor edad (> 36 semanas) (Lusiyati et al. 2013). Esto sugiere que la administración de las cepas probióticas puede ejercer un efecto modulador sobre el SI de los niños prematuros.

Es importante tener en cuenta que el volumen de las muestras de sangre que se puede extraer de los prematuros con fines clínicos es, generalmente, muy pequeño. Por lo tanto, es necesario aplicar tecnologías multiplex, como la utilizada en este estudio, para poder analizar simultáneamente un gran número de compuestos inmunitarios (Lusiyati et al. 2013, Takahashi et al. 2013). En cualquier caso, los resultados que se han obtenido en esta Tesis deben

interpretarse con cautela debido a tres limitaciones importantes: (1) la ausencia de un grupo control; (2) un tamaño muestral muy pequeño; y (3) la gran escasez de estudios previos que se ocupen de las características inmunológicas de los niños nacidos con un peso muy bajo y de cómo se pueden ver afectadas después de un tratamiento con probióticos.

Además, los niños de peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer suelen requerir una intervención médica muy individualizada (antibióticos, oxígeno, corticoides, ibuprofeno, transfusiones, etc.) durante, al menos, los primeros días de vida debido a una amplia variedad de problemas potencialmente mortales. Tanto estos problemas, como sus correspondientes tratamientos, pueden alterar el proceso de colonización intestinal y, por *ende*, las respuestas inmunitarias de los niños. Además, es muy difícil obtener una población homogénea de prematuros con peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer. Esta es otra limitación importante a la que los estudios de intervención, incluyendo la administración de probióticos, se deben enfrentar al abordar esta subpoblación infantil.

A pesar de todas las limitaciones citadas anteriormente, en esta Tesis se observó una reducción significativa de la concentración fecal de calprotectina, un importante marcador de inflamación (Rouge et al. 2010, Aydemir et al. 2012), a lo largo del tratamiento probiótico. Se trata de un resultado prometedor que debe ser confirmado en ensayos futuros en los que se reclute a un número mayor de niños. El aumento de la concentración de IgA observado en el día 7 puede ser debido a una intensificación del proceso de colonización intestinal, lo que desencadena la producción de esta inmunoglobulina por parte del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (Suzuki et al. 2007). Las moléculas de IgA son capaces de penetrar la superficie de la mucosa intestinal unida a antígenos y, en consecuencia, de inducir respuestas inmunitarias efectoras, jugando un papel clave en el mantenimiento de la microbiota intestinal y la homeostasis inmunológica (Rogosch et al. 2012).

El análisis multivariado aplicado a las muestras de plasma y de heces de los cinco niños reveló una clara relación entre los parámetros evaluados en este trabajo y la evolución clínica de los RN. En el análisis de redundancia (RDA) elaborado con los parámetros fecales, la colonización microbiana actuó como el principal agente opuesto a los niveles de ciertos inmunocompuestos pro-inflamatorios y en concordancia con las variables clínicas asociadas con una mejora de la salud de los bebés. Puesto que los coeficientes de las especies bacterianas tuvieron valores positivos en el eje RDA1, la calprotectina y otros parámetros pro-inflamatorios, como IL-8, MIP-1 $\beta$ , MCP-1, G-CSF, o TNF- $\alpha$ , mostraron valores negativos. Los coeficientes del eje RDA1 para IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> fueron negativos mientras que los de las inmunoglobulinas secretoras IgA e IgM fueron positivos. Como se ha señalado anteriormente, estos resultados deben tomarse con cautela debido a las limitaciones inherentes a este ensayo

clínico y al alto número de interacciones potenciales y factores de confusión; no obstante, sugieren que la administración de las cepas probióticas impide, al menos parcialmente, una colonización microbiana intestinal anormal, que predispone al intestino neonatal a la inflamación y a una cascada de respuestas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias mediadas por citoquinas (Mai et al. 2013). Por otro lado, la evolución de la microbiota de los lactantes fue diferente a la observada en prematuros que no recibieron probióticos (Moles et al. 2013) pero similar a la de aquellos a los que se administraron otras cepas probióticas (Mohan et al. 2006).

Los dendrogramas obtenidos para las muestras y variables representadas en *heatmaps* parecen reforzar la hipótesis de que las cepas probióticas pueden contribuir al desarrollo de una colonización bacteriana normal y que este proceso es esencial para reducir el coste sanitario asociado a la prematuridad (Siggers et al. 2011, Mai et al. 2011). Aunque la cohorte del ensayo fue muy pequeña, la administración de las cepas probióticas mostró una influencia claramente prometedora sobre la colonización intestinal, incluyendo un aumento de la diversidad bacteriana, en general, y de la presencia de lactobacilos y bifidobacterias, en particular.

En los últimos años, se ha constatado que la microbiota intestinal de los niños prematuros presenta ciertas características que la diferencian claramente de la de los nacidos a término. Entre ellas, destacan dos: (a) una menor diversidad, lo que supone la pérdida de funciones metabólicas, inmunológicas y de barrera, que son particularmente relevantes en esa época de la vida; y (b) un dominio abrumador de microorganismos del ámbito hospitalario que, de este modo, tienen fácil acceso a un hospedador particularmente predispuesto a padecer infecciones. En consecuencia, existe un creciente interés en el desarrollo de estrategias que permitan modular el proceso de establecimiento de la microbiota en los neonatos prematuros. Para desarrollar con éxito tales estrategias, resulta fundamental un conocimiento detallado de la microbiota y del microbioma de la pareja madre-hijo y, también, del proceso de establecimiento de la microbiota intestinal en estos niños.

Una de las estrategias podría ser la aplicación de probióticos específicamente seleccionados para dicha población. Es importante señalar que las propiedades probióticas dependen de cada cepa; es decir, cuando se adscribe un efecto probiótico a una cepa, no se puede extrapolar esa propiedad a las restantes cepas de la misma especie. Además, la adscripción de un efecto probiótico de una cepa depende, entre otros factores, de la dosis (típicamente  $> 10^8$  ufc), forma de administración, sistema de producción y condiciones de almacenamiento.

La administración de probióticos por vía enteral podría jugar un papel relevante en la reducción de la mortalidad y la morbilidad asociada a las

infecciones neonatales mediante la prevención de la migración bacteriana a través de las mucosas, la exclusión competitiva de bacterias potencialmente patógenas y la mejora de la respuesta inmunitaria del huésped. Hasta el momento, el número de estudios sobre los efectos de los probióticos en niños prematuros es relativamente bajo pero ha empezado a aumentar rápidamente en los dos últimos años. Todos ellos han demostrado que son seguros, un hecho muy relevante ya que la administración de bacterias vivas a niños que *a priori* están muy inmunodeprimidos, siempre había despertado recelo, preocupación e incluso rechazo; adicionalmente, la mayoría de los estudios ha mostrado que algunas cepas probióticas pueden ser eficaces para la prevención de la enterocolitis necrotizante y/o de las sepsis en esta población (Rich et al. 2005, Luthje, Schwarz 2006, Schmidt et al. 2014, Gao et al. 2015). Todos los meta-análisis publicados recientemente han puesto en evidencia un impacto positivo significativo sobre diversos parámetros clínicos (Fischer et al. 2016). En un meta-análisis, que incluía 24 ensayos, se observó una disminución significativa de la incidencia de NEC y de la mortalidad por cualquier causa (Oliver et al. 2011).

Aunque es obvio que se necesitarán ensayos clínicos multicéntricos que impliquen un número mucho más elevado de niños y un mayor tiempo de intervención para determinar la eficacia clínica (prevención de sepsis o enterocolitis necrotizante, reducción del tiempo de estancia en la UCIN...) de las cepas probióticas, los resultados de este trabajo pueden resultar útiles para futuros estudios relacionados con el empleo de probióticos en niños de peso extremadamente bajo al nacer y, en particular, con la detección y cuantificación de inmunocompuestos en las muestras de heces y sangre obtenidas en esta población.

#### V.5. Modulación de la microbiota infantil mediante el empleo de cepas probióticas comerciales

El empleo de una cepa probiótica para una población concreta requiere, en primer lugar, la evaluación de su seguridad y tolerancia por parte de la población diana y, posteriormente, la determinación de su eficacia en ensayos clínicos correctamente diseñados. Este proceso implica un coste económico relevante y periodo de tiempo relativamente largo, por lo que -en la práctica- no son muchas las cepas que, finalmente, llegan al mercado con las evidencias de seguridad y eficacia recomendadas por la FAO y la OMS (FAO/WHO 2002). Este es el caso de *B. infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 y *B. bifidum* R0071, cepas con las que se han realizado diversos estudios tanto en modelos animales como en ensayos humanos con niños de entre 1 y 7 años (Wine et al. 2009, Cazzola et al. 2010a, Cazzola et al. 2010b).

Para valorar su seguridad, tolerancia y efecto en otra población (niños de 3 a 12 meses) era necesario un nuevo estudio, abordado como el último capítulo de esta Tesis Doctoral. En este ensayo se reclutaron 221 niños, de los que 202 completaron el estudio. Entre ellos, 198 niños cumplieron con los requisitos establecidos en el protocolo aprobado por el Comité de Ética y conformaron la población final analizada.

El crecimiento es un parámetro muy relevante en la evaluación de la seguridad de aquellas cepas destinadas a la población infantil, ya que es un signo no específico de la salud general y del estado nutricional de un niño, y es sencillo de registrar. En general, los estudios de crecimiento deben incluir mediciones de, al menos, peso, longitud y circunferencia de la cabeza (Szajewska et al. 2013). En este ensayo, se demostró la equivalencia en el crecimiento de todos los participantes, independientemente del grupo en el que se incluyeron. Estos resultados están de acuerdo con los observados en estudios previos con otros probióticos (Lee et al. 2015).

Un aspecto muy importante de la evaluación de seguridad es el registro de los eventos adversos acontecidos en los niños participantes durante el estudio. Los acontecimientos adversos (AA) se clasificaron siguiendo el criterio establecido en el *Medical Dictionary for Regulatory Activities* (MedDRA) (Raiha et al. 2002). Ninguno de los participantes sufrió ningún acontecimiento adverso grave durante el estudio y el número de acontecimientos adversos registrados durante la duración del ensayo estuvo por debajo del 10%, cifra que se considera como no relevante. En cualquier caso, el número total de AA registrados fue equivalente entre los grupos y, por lo tanto, no se pudieron atribuir a la ingesta de las cepas administradas a los niños. Estos resultados también son similares a los observados en otros estudios, apoyando la seguridad de las cepas de lactobacilos y bifidobacterias empleadas como probióticos (Weizman, Alsheikh 2006, Dekker et al. 2007, Chouraqui et al. 2008, Allen et al. 2010).

Otro parámetro que se tuvo en cuenta en la evaluación de estas cepas fue la concentración de ácido D-láctico en la orina. Hasta la fecha no hay ningún caso documentado de acidosis D-láctica debido a la ingesta de cepas de *Lactobacillus* en bebés sanos. Por el contrario, se ha demostrado que la administración de una cepa de *Lactobacillus reuteri* productora de D-lactato a niños con síndrome de intestino corto conduce a una remisión más rápida de la sintomatología que cuando se emplean cepas probióticas que únicamente producen L-lactato (Connolly, Lönnerdal 2003). En este trabajo, los niveles de D-lactato en las muestras de orina analizadas estaban por debajo del límite de cuantificación del método (33  $\mu$ M o 3,6 - 105 mmol/mol de creatinina), considerando los rangos de referencia de creatinina en lactantes de menos de 2 años (<https://www.mayomedicallaboratories.com/test-info/pediatric/refvalues/reference.php>, 2017). Las concentraciones urinarias de D-lactato registradas en bebés sanos después del consumo de diferentes cepas del género *Lactobacillus*

suelen ser bastante variables, lo que sugiere que no se pueden atribuir a su ingesta (Haschke-Becher et al. 2008, Papagaroufalidis et al. 2014, Vitetta et al. 2017).

Las evaluaciones de las características de las heces también puede ayudar a la evaluación de la tolerancia de un probiótico (Saavedra et al. 2004). En este estudio, se evaluaron semanalmente encontrando que eran equivalentes entre los distintos grupos y el grupo control. En conclusión, la administración de *B. longum* subsp. *infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 y *B. bifidum* R0071 a niños menores de 1 año se puede considerar como segura y bien tolerada.

Dentro de la evaluación de la seguridad y tolerancia de las cepas *B. longum* subsp. *infantis* R0033, *L. helveticus* R0052 y *B. bifidum* R0071 en la población lactante de 3 a 12 meses, se planteó el análisis del microbioma y de diversos parámetros inmunológicos en las muestras de heces, antes y después de la ingesta de las cepas probióticas. Estos aspectos han sido evaluados en poblaciones infantiles con distintos problemas de salud, incluyendo alergias (Abrahamsson et al. 2009, Lahtinen et al. 2009, Berni Canani et al. 2016, Mazzocchi et al. 2017), cólicos (Sung et al. 2014), enfermedad celíaca (Klemenak et al. 2015, Quagliarello et al. 2016) o prematuros (Mohan et al. 2006, Campeotto et al. 2011, Moles et al. 2015). Sin embargo, pocos estudios han evaluado lo que ocurre en niños sanos tratados con probióticos (Maldonado et al. 2010, Maldonado-Lobon et al. 2015, Wu et al. 2016).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran el predominio de bifidobacterias en las muestras fecales de los niños incluidos en el ensayo. En estudios previos, *B. longum* (en especial, la subespecie *infantis*) fue la especie más abundante de este género (Klassens et al. 2009, Turróni et al. 2012; Underwood et al. 2015). La cantidad de secuencias correspondientes a especies de bifidobacterias únicamente disminuyó en el grupo placebo tras el período de 8 semanas de intervención; en consecuencia, nuestros resultados indicaron que el mantenimiento de las bacterias de este género se vio favorecido en aquellos niños que consumieron alguna de las cepas probióticas. La colonización intestinal con especies del género *Bifidobacterium* está asociada con un efecto antiinflamatorio y de mejora de la barrera intestinal (Hart et al. 2004), con el incremento de la respuesta vacunal (Underwood et al. 2015) y con el control del crecimiento de diversos patógenos (Serafini et al. 2013). Por otra parte, las muestras del grupo placebo mostraron una mayor abundancia de secuencias pertenecientes a géneros tales como *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Coprococcus* y *Faecalibacterium*, que son constituyentes comunes de la microbiota sana del intestino del adulto (Ringel-Kulka et al. 2013). Por lo tanto, los niños del grupo de placebo poseían una composición bacteriana fecal estrechamente relacionada con el proceso de destete, caracterizada por una rápida evolución hacia la microbiota de un individuo adulto (Cheng et al. 2016).



Generalmente, los niños que lactan presentan una concentración intestinal de bifidobacterias mayor que la de aquellos que se alimentan con fórmulas infantiles (Oozeer et al. 2013). Este hecho se debe a dos factores principales: (1) por un lado, la leche puede ser, por sí misma, una fuente de este tipo de bacterias para el lactante; y (2) la presencia de oligosacáridos en la leche humana, que actúan como sustratos que fomentan el crecimiento de las bifidobacterias en el intestino. Estos dos hechos hacen que su concentración sea mayor. Sin embargo, en el momento que se introducen alimentos sólidos en la dieta del lactante, la microbiota cambia, reduciéndose rápidamente el número de bifidobacterias e incrementándose la diversidad de la microbiota (**Fig. 23**) (Laursen et al. 2017).

Como se ha comentado anteriormente, en este estudio también se analizaron una amplia gama de parámetros inmunológicos en las muestras fecales, lo que permitió la evaluación de los posibles efectos inmumoduladores asociados a las cepas probióticas administradas a los niños. Hasta la fecha, la evaluación de los efectos inmunológicos de cepas de lactobacilos y bifidobacterias se había limitado a un número relativamente pequeño de compuestos, como la sIgA o la calprotectina fecal (Scholtens et al. 2008, van de Ven et al. 2014, Sierra et al. 2015) y, en general, en el contexto de alguna patología intestinal (Hevia et al. 2015). En contraste, muy pocos estudios se han centrado en una población de niños sanos, lo que da un valor añadido al trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral.

En relación a las cepas administradas en este estudio, no se observaron cambios inmunológicos significativos en ninguno de los grupos durante el período de intervención, con la excepción de un aumento significativo en la concentración de IFN- $\gamma$  en el grupo *B. infantis* R0033 ( $P= 0,036$ ) y en la de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-8 en el grupo placebo ( $P= 0,022$ ,  $P= 0,009$  y  $P= 0,012$ , respectivamente). Por otra parte, las concentraciones de INF- $\gamma$  e IL-4 variaron de una forma diferente dependiendo de cada grupo ( $P= 0,008$  y  $P= 0,042$ , respectivamente). Además, se calcularon las proporciones de IL-10/IL-12 y TNF $\alpha$ /IL-10 para evaluar el estado antiinflamatorio y proinflamatorio, respectivamente, en las muestras fecales, tal y como se ha hecho anteriormente en otras situaciones, como en la enfermedad coronaria (Dopheide et al. 2015), la hiperglicemia asociada al embarazo (Moreli et al. 2015) o los trasplantes renales (Cherukuri et al. 2014). La relación IL-10/IL-12 aumentó después de la administración de *B. infantis* R0033. Sin embargo, esta misma *ratio* no sólo disminuyó en las muestras del grupo placebo sino que coincidió con un aumento de la relación TNF $\alpha$ /IL-10. La relación proinflamatoria también aumentó significativamente en los niños que ingirieron la cepa *L. helveticus* R0052. En definitiva, se observó un efecto inmunomodulador en los tres grupos a los que le fue administrada una de las cepas probióticas mientras que en el grupo placebo se observó un incremento significativo en los compuestos pro-inflamatorios. El efecto cepa-específico asociado a *B. infantis* R0033 y *L. helveticus* R0052 se confirmó en el análisis de factores múltiples. Esta herramienta estadística

multifactorial reveló el efecto modulador de *B. infantis* R0033 y *B. bifidum* R0071 mostrando una relación directa entre la composición microbiana y el perfil de compuestos inmunitarios presentes en las muestras fecales.

Globalmente, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el uso de algunas cepas con propiedades probióticas en la vida temprana puede modular el desarrollo de la microbiota intestinal y del sistema inmunitario infantil. No obstante, todavía se desconocen las consecuencias a largo plazo de las intervenciones con probióticos en las primeras etapas de la vida.





## CAPÍTULO VI

---

## CONCLUSIONES



## CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en el transcurso de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

PRIMERA. La leche humana contiene un metagenoma complejo constituido por el genoma de las células epiteliales e inmunitarias humanas y el de las bacterias, arqueas, virus, hongos y protozoos que puede contener. Globalmente, el microbioma común de la leche de mujeres sanas incluye los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Lactobacillus* y *Propionibacterium*. A nivel de especie, existe un alto grado de variabilidad interindividual entre las muestras proporcionadas por este grupo de mujeres. En los casos de mastitis, el microbioma de leche refleja una pérdida de diversidad bacteriana y un notable aumento de las secuencias relacionadas con los presuntos agentes etiológicos.

*FIRST. Human milk contain a complex metagenome constituted by the genome of human epithelial and immune cells together with those provided by bacteria, archaea, viruses, fungi and protozoa. Globally, the healthy core microbiome included the genera Staphylococcus, Streptococcus, Bacteroides, Faecalibacterium, Ruminococcus, Lactobacillus, and Propionibacterium. At the species level, a high degree of inter-individual variability was observed among healthy women. In mastitis cases, the milk microbiome reflects a loss of bacterial diversity and a high increase of the sequences related to the presumptive etiological agents.*

\*\*\*\*\*

SEGUNDA. La administración oral de *Lactobacillus salivarius* PS2 a mujeres con mastitis condujo a la remisión total o parcial de la sintomatología; además, el tratamiento con el probiótico, tanto en mujeres con mastitis como sin mastitis, estuvo asociado con cambios beneficiosos en diversos parámetros efectos microbiológicos, inmunológicos y bioquímicos en las muestras de leche, sangre y/o orina obtenidas antes y después de la intervención. Dichos parámetros



serán útiles como biomarcadores en futuros estudios clínicos que impliquen a una cohorte más grande.

*SECOND. Oral administration of Lactobacillus salivarius PS2 to mastitis-suffering women led to a total or partial clinical recovery. In addition, the probiotic treatment, both in women with or without mastitis, was associated with beneficial changes in several microbiological, immunological and biochemical parameters in the milk, blood and/or urine samples obtained before and after the intervention. These parameters will be useful as biomarkers in future clinical studies involving a larger cohort.*

\*\*\*\*\*

TERCERA. La administración oral de dos bacterias lácticas (*Lactococcus lactis* MG1614 y *Lactobacillus salivarius* PS2), previamente transformadas con un plásmido que contenía los genes *lux*, a ratonas gestantes condujo a la presencia de bacterias transformadas en diferentes localizaciones, incluyendo el tejido mamario y la leche. Este resultado refuerza la hipótesis de que la translocación fisiológica de ciertas bacterias maternas durante el embarazo y la lactancia puede contribuir a la composición de la microbiota de la leche.

*THIRD. The oral administration of two lactic acid bacteria strains (Lactococcus lactis MG1614 and Lactobacillus salivarius PS2), previously transformed with a plasmid containing the lux genes, to pregnant mice led to the presence of the transformed bacteria in different body locations, including mammary tissue and milk. This result reinforce the hypothesis that physiological translocation of maternal bacteria during pregnancy and lactation may contribute to the composition of the milk microbiota.*

\*\*\*\*\*

CUARTA. La administración de *Bifidobacterium breve* PS12929 y *Lactobacillus salivarius* PS12934, dos cepas probióticas aisladas de leche humana, a niños prematuros de baja edad gestacional y/o peso extremadamente bajo al nacer es segura, resulta bien tolerada y provoca efectos moduladores en su microbiota y sistema inmunitario.

*FOURTH. The administration of Bifidobacterium breve PS12929 and Lactobacillus salivarius PS12934, two probiotic strains isolated from human milk, is safe, well tolerated and causes modulatory effects on their microbiome and immune system.*

\*\*\*\*\*

QUINTA. La administración de las cepas comerciales *Bifidobacterium infantis* R0033, *Lactobacillus helveticus* R0052 y *Bifidobacterium bifidum* R0071 a una población de niños sanos de entre 3 a 12 meses de edad es segura, resulta bien tolerada y provoca efectos moduladores en su microbioma y sistema inmunitario.

*FIFTH. The administration of the commercial strains Bifidobacterium infantis R0033, Lactobacillus helveticus R0052 and Bifidobacterium bifidum R0071 to a healthy infants between 3 and 12 months of age is safe, well tolerated and causes modulatory effects on their microbiome and immune system.*





## CAPÍTULO VII

---

## TABLAS Y FIGURAS



## CAPÍTULO VII. TABLAS Y FIGURAS

### VII.1. Tablas

- Tabla 1** Compuestos bioactivos de la leche humana.
- Tabla 2** Principales géneros y especies bacterianas aisladas de leche humana.
- Tabla 3** Agentes etiológicos implicados en los distintos tipos de mastitis.
- Tabla 4** Tratamientos de las mastitis infecciosas.
- Tabla 5** Nivel de riesgo y parámetros cinéticos de diversos medicamentos empleados en el tratamiento de las mastitis.
- Tabla 6** Rutas involucradas cuando la selección de genes implicados comprende únicamente el *fold-change*  $> 0$  o  $< 2$ .

### VII.2. Figuras

- Figura 1** Esquema del proceso evolutivo de los mamíferos y la glándula mamaria.
- Figura 2** Anatomía de la glándula mamaria.
- Figura 3** Tipos de pezón.
- Figura 4** Estructura del acino de la glándula mamaria.
- Figura 5** Desarrollo embrionario y postnatal de la glándula mamaria.
- Figura 6** Esquema de las vías por las que se secretan los diferentes componentes de la leche humana.
- Figura 7** PCA de las diferentes comunidades bacterianas establecidas en el cuerpo humano.
- Figura 8** Conductos galactóforos en condiciones normales y en caso de padecer mastitis infecciosa.
- Figura 9** Sintomatología de los diferentes tipos de mastitis.
- Figura 10** Imágenes de casos reales de mastitis infecciosa.
- Figura 11** Imágenes de casos de mastitis granulomatosas.
- Figura 12** Factores implicados en el padecimiento de las mastitis infecciosas.
- Figura 13** Formación de un *biofilm* bacteriano.
- Figura 14** Directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos.
- Figura 15** Etapas básicas desde el aislamiento inicial hasta la comercialización de un probiótico.



- Figura 16** El “marco probiótico” y relaciones entre los sectores implicados en el campo de los probióticos.
- Figura 17** Tipos de efectos distribuidos en los probióticos.
- Figura 18** Diseño típico de los estudios de toxicidad oral en ratas.
- Figura 19** Representación esquemática de algunos de los efectos que pueden ejercer los probióticos en un hospedador.
- Figura 20** Esquema del Eje cerebro-intestino.
- Figura 21** Representación esquemática de los factores por los cuales la microbiota humana se adquiere temprano en la vida.
- Figura 22** Bifidobacterias en las heces de niños recién nacidos alimentados con leche humana o con fórmula infantil.
- Figura 23** Evolución de los principales géneros bacterianos en la microbiota intestinal del recién nacido durante sus primeros meses de vida.
- Figura 24** Colonoscopia para trasplante fecal.
- Figura 25** Diagrama de barras mostrando el índice de diversidad Shannon-Weaver de cada una de las muestras estudiadas.
- Figura 26** Esquema del estudio.
- Figura 27** Análisis de componentes principales de las muestras de leche y sangre recogidas.
- Figura 28** Esquema representando a la ruta entero-mamaria.
- Figura 29** Cambios acaecidos durante el embarazo.



# CAPÍTULO VIII


---

## GLOSARIO



## CAPÍTULO VIII. GLOSARIO

<b>16S rRNA</b>	ARN ribosomal 16S
<b>AB</b>	Amina biógena
<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
<b>ASM</b>	Sociedad Americana de Microbiología
<b>ATCC</b>	Colección americana de cultivos tipo
<b>CECT</b>	Colección española de cultivos tipo
<b>CLSI</b>	Instituto para los estándares clínicos y de laboratorio
<b>CFU</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>DAO</b>	Diamino oxidasa
<b>DGGE</b>	Electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EUCAST</b>	Comité europeo para el testado de la susceptibilidad antimicrobiana
<b>FAO</b>	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
<b>FTU2</b>	Fucosil transferasa 2
<b>GBS</b>	Estreptococos del grupo B
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>HAMLET</b>	Alfa-lactalbúmina humana letal para células tumorales
<b>HMO</b>	Oligosacáridos de la leche humana
<b>HTLV-1</b>	Virus linfotrópico de células T humano Tipo I
<b>Ig's</b>	Inmunoglobulinas
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento similar a insulina 1
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IRAK-4</b>	Receptor asociado a la kinasa 4 de la interleucina 1
<b>ISSAP</b>	Asociación científica internacional para los probióticos y prebióticos
<b>LactMed</b>	Drugs and lactation database
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>M.a.</b>	Millones de años
<b>MALDI-TOF MS</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo espectrometría de masas
<b>MALT</b>	Tejido linfóide asociado a las mucosas
<b>MAO</b>	Monoamino oxidasa
<b>MeSH</b>	Encabezados de Temas Médicos
<b>MyD88</b>	Respuesta Primaria de Diferenciación Mieloide 88
<b>NGS</b>	Secuenciación de nueva generación
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NOD2</b>	Dominio de oligomerización por unión de nucleótidos que contiene la proteína 2

<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud 
<b>PBP2a</b>	Proteína de unión a la penicilina a
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFGE</b>	Electroforesis en gel de campo pulsado
<b>PIA</b>	Polisacárido intercelular
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares Neutrófilos
<b>PUFA</b>	Ácido graso poliinsaturado
<b>QPS</b>	Presunción cualificada de seguridad
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a la meticilina
<b>SCFA</b>	Ácido graso de cadena corta
<b>SCN</b>	Estafilococo coagulasa-negativo
<b>SEIMC</b>	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
<b>SEPyP</b>	Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos
<b>SERM</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> resistentes a la meticilina
<b>SI</b>	Sistema Inmunitario
<b>sIgA</b>	Inmunoglobulina A secretada
<b>SNE</b>	Sistema Nervioso Entérico
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido
<b>TG</b>	Triglicérido
<b>Th</b>	Linfocito T <i>helper</i>
<b>TLR</b>	Receptores de tipo Toll
<b>TNO</b>	Organización holandesa para la investigación de ciencias aplicadas
<b>UCIN</b>	Unidad de cuidados intensivos neonatales
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana



## CAPÍTULO IX

---

## BIBLIOGRAFÍA





## CAPÍTULO IX. BIBLIOGRAFÍA

- AAGAARD, K., MA, J., ANTONY, K.M., GANU, R., PETROSINO, J. and VERSALOVIC, J., 2014. The placenta harbors a unique microbiome. *Science translational medicine*, **6**(237), pp. 237ra65.
- AAKKO, J., KUMAR, H., RAUTAVA, S., WISE, A., AUTRAN, C., BODE, L., ISOLAURI, E. and SALMINEN, S., 2017. Human milk oligosaccharide categories define the microbiota composition in human colostrum. *Beneficial microbes*, **8**(4), pp. 563-567.
- ABRAHAMSSON, T.R., SINKIEWICZ, G., JAKOBSSON, T., FREDRIKSON, M. and BJORKSTEN, B., 2009. Probiotic *lactobacilli* in breast milk and infant stool in relation to oral intake during the first year of life. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **49**(3), pp. 349-354.
- ABREU, M.T., 2010. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature reviews. Immunology*, **10**(2), pp. 131-144.
- ABUHANDAN, M., DEMIR, N., GUZEL, B., ALMAZ, V., KOCA, B., TUNCER, O. and CAKMAK, A., 2015. An Evaluation of Oxidative Status in Serum and Breast Milk of Mothers Giving Birth Prematurely and at Full-Term. *Iranian journal of pediatrics*, **25**(4), pp. e2363.
- ADEFURIN, A., SAMMONS, H., JACQZ-AIGRAIN, E. and CHOONARA, I., 2011. Ciprofloxacin safety in paediatrics: a systematic review. *Archives of Disease in Childhood*, **96**(9), pp. 874-880.
- ADLERBERTH, I., 2008. Factors influencing the establishment of the intestinal microbiota in infancy. *Nestle Nutrition workshop series. Paediatric programme*, **62**, pp. 13-29; discussion 29-33.
- AGARWAL, S., KARMAUS, W., DAVIS, S. and GANGUR, V., 2011. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **27**(2), pp. 171-186.
- AITKEN, S.L., CORL, C.M. and SORDILLO, L.M., 2011. Immunopathology of mastitis: insights into disease recognition and resolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **16**(4), pp. 291-304.
- ALAIN, K., KARROW, N.A., THIBAUT, C., ST-PIERRE, J., LESSARD, M. and BISSONNETTE, N., 2009. Osteopontin: an early innate immune marker of *Escherichia coli* mastitis harbors genetic polymorphisms with possible links with resistance to mastitis. *BMC genomics*, **10**, pp. 444-2164-10-444.
- ALBESHARAT, R., EHRMANN, M.A., KORAKLI, M., YAZAJI, S. and VOGEL, R.F., 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and applied microbiology*, **34**(2), pp. 148-155.
- ALBRECHT, S., SCHOLS, H.A., VAN DEN HEUVEL, E.G., VORAGEN, A.G. and GRUPPEN, H., 2011. Occurrence of oligosaccharides in feces of breast-fed babies in their first six months of life and the corresponding breast milk. *Carbohydrate research*, **346**(16), pp. 2540-2550.
- ALFALEH, K. and ANABREES, J., 2013. Efficacy and safety of probiotics in preterm infants. *Journal of neonatal-perinatal medicine*, **6**(1), pp. 1-9.
- ALHUSSIEN, M., MANJARI, P., MOHAMMED, S., SHEIKH, A.A., REDDI, S., DIXIT, S. and DANG, A.K., 2016. Incidence of mastitis and activity of milk neutrophils in Tharparkar cows reared under semi-arid conditions. *Tropical animal health and production*, **48**(6), pp. 1291-1295.
- ALLEN, L.H., 2012. B vitamins in breast milk: relative importance of maternal status and intake, and effects on infant status and function. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, **3**(3), pp. 362-369.
- ALLEN, S.J., MARTINEZ, E.G., GREGORIO, G.V. and DANS, L.F., 2010. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *The Cochrane database of systematic reviews*, **(11):CD003048**. doi (11), pp. CD003048.
- ALLEN-BLEVINS, C.R., SELA, D.A. and HINDE, K., 2015. Milk bioactives may manipulate microbes to mediate parent-offspring conflict. *Evolution, medicine, and public health*, **2015**(1), pp. 106-121.

- ALLEN-VERCOE, E., REID, G., VINER, N., GLOOR, G.B., HOTA, S., KIM, P., LEE, C., O'DOHERTY, K., VANNER, S.J., WEESE, J.S. and PETROF, E.O., 2012. A Canadian Working Group report on fecal microbial therapy: microbial ecosystems therapeutics. *Canadian journal of gastroenterology Journal Canadien de Gastroenterologie*, **26**(7), pp. 457-462.
- AMMOR, M.S., FLOREZ, A.B. and MAYO, B., 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, **24**(6), pp. 559-570.
- ANDREAS, N.J., AL-KHALIDI, A., JAITEH, M., CLARKE, E., HYDE, M.J., MODI, N., HOLMES, E., KAMPMANN, B. and MEHRING LE DOARE, K., 2016. Role of human milk oligosaccharides in Group B *Streptococcus* colonisation. *Clinical & translational immunology*, **5**(8), pp. e99.
- ANDREAS, N.J., KAMPMANN, B. and MEHRING LE-DOARE, K., 2015. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early human development*, **91**(11), pp. 629-635.
- ARBOLEYA, S., RUAS-MADIEDO, P., MARGOLLES, A., SOLÍS, G., SALMINEN, S., DE LOS REYES-GAVILÁN, C.G. and GUEIMONDE, M., 2011. Characterization and in vitro properties of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-milk. *International journal of food microbiology*, **149**(1), pp. 28-36.
- ARDANUY, C., CERCENADO, E., MOROSINI, M.I. and TORRES, C., 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en grampositivos. *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2ª Edición edn. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- ARDISSONE, A.N., DE LA CRUZ, D.M., DAVIS-RICHARDSON, A.G., REHCIGL, K.T., LI, N., DREW, J.C., MURGAS-TORRAZZA, R., SHARMA, R., HUDAK, M.L., TRIPLETT, E.W. and NEU, J., 2014. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PloS one*, **9**(3), pp. e90784.
- ARES, S., ARENA, J. and DÍAZ-GÓMEZ, N.M., 2016. The importance of maternal nutrition during breastfeeding: Do breastfeeding mothers need nutritional supplements? *Anales de pediatria (Barcelona, Spain 2003)*, **84**(6), pp. 347.e1-347.e7.
- ARROYO, R., MEDIANO, P., MARTÍN, V., JIMÉNEZ, E., DELGADO, S., FERNÁNDEZ, L., MARÍN, M. and RODRÍGUEZ, J.M., 2011. Diagnóstico etiológico de las mastitis infecciosas: propuesta de protocolo para el cultivo de muestras de leche humana. *Acta Pediatr Esp*, **69**(6), pp. 276-281.
- ARROYO, R., MARTÍN, V., MALDONADO, A., JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2010. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **50**(12), pp. 1551-1558.
- ARUMUGAM, M., RAES, J., PELLETIER, E., LE PASLIER, D., YAMADA, T., MENDE, D.R., FERNANDES, G.R., TAP, J., BRULS, T., BATTO, J.M., BERTALAN, M., BORRUEL, N., CASELLAS, F., FERNÁNDEZ, L., GAUTIER, L., HANSEN, T., HATTORI, M., HAYASHI, T., KLEEREBEZEM, M., KUOKAWA, K., LECLERC, M., LEVENEZ, F., MANICHANH, C., NIELSEN, H.B., NIELSEN, T., PONS, N., POULAIN, J., QIN, J., SICHERITZ-PONTEN, T., TIMS, S., TORRENTS, D., UGARTE, E., ZOETENDAL, E.G., WANG, J., GUARNER, F., PEDERSEN, O., DE VOS, W.M., BRUNAK, S., DORÉ, J., METAHIT CONSORTIUM, ANTOLIN, M., ARTIGUENAVE, F., BLOTTIERE, H.M., ALMEIDA, M., BRECHOT, C., CARA, C., CHERVAUX, C., CULTRONE, A., DELORME, C., DENARIAZ, G., DERVYN, R., FOERSTNER, K.U., FRISS, C., VAN DE GUCHTE, M., GUEDON, E., HAIMET, F., HUBER, W., VAN HYLCKAMA-VLIEG, J., JAMET, A., JUSTE, C., KACI, G., KNOL, J., LAKHDARI, O., LAYEC, S., LE ROUX, K., MAGUIN, E., MERIEUX, A., MELO MINARDI, R., M'RINI, C., MULLER, J., OOZEER, R., PARKHILL, J., RENAULT, P., RESCIGNO, M., SANCHEZ, N., SUNAGAWA, S., TORREJON, A., TURNER, K., VANDEMEULEBROUCK, G., VARELA, E., WINOGRADSKY, Y., ZELLER, G., WEISSENBAACH, J., EHRLICH, S.D. and BORK, P., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, **473**(7346), pp. 174-180.
- ARVOLA, T., RUUSKA, T., KERANEN, J., HYOTY, H., SALMINEN, S. and ISOLAURI, E., 2006. Rectal bleeding in

- infancy: clinical, allergological, and microbiological examination. *Pediatrics*, **117**(4), pp. e760-8.
- ATIYA ALI, M., STRANDVIK, B., SABEL, K.G., PALME KILANDER, C., STROMBERG, R. and YNGVE, A., 2014. Polyamine levels in breast milk are associated with mothers' dietary intake and are higher in preterm than full-term human milk and formulas. *Journal of human nutrition and dietetics: the official journal of the British Dietetic Association*, **27**(5), pp. 459-467.
- AYCICEK, A., EREL, O., KOCYIGIT, A., SELEK, S. and DEMIRKOL, M.R., 2006. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **22**(6), pp. 616-619.
- AYDEMIR, G., CEKMEZ, F., TANJU, I.A., CANPOLAT, F.E., GENÇ, F.A., YILDIRIM, S., TUNC, T. and SARICI, S.U., 2012. Increased fecal calprotectin in preterm infants with necrotizing enterocolitis. *Clinical laboratory*, **58**(7-8), pp. 841-844.
- BÄCKHED, F., ROSWALL, J., PENG, Y., FENG, Q., JIA, H., KOVATCHEVA-DATCHARY, P., LI, Y., XIA, Y., XIE, H., ZHONG, H., KHAN, M., ZHANG, J., LI, J., XIAO, L., AL-AAMA, J., ZHANG, D., LEE, Y., KOTOWSKA, D., COLDING, C., TREMAROLI, V., YIN, Y., BERGMAN, S., XU, X., MADSEN, L., KRISTIANSEN, K., DAHLGREN, J. and WANG, J., 2015. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host & Microbe*, **17**(5), pp. 690-703.
- BAKKEN, J.S., BORODY, T., BRANDT, L.J., BRILL, J.V., DEMARCO, D.C., FRANZOS, M.A., KELLY, C., KHORUTS, A., LOUIE, T., MARTINELLI, L.P., MOORE, T.A., RUSSELL, G., SURAWICZ, C. and FECAL MICROBIOTA TRANSPLANTATION WORKGROUP, 2011. Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, **9**(12), pp. 1044-1049.
- BALLARD, O. and MORROW, A.L., 2013. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatric clinics of North America*, **60**(1), pp. 49-74.
- BALZAN, S., DE ALMEIDA QUADROS, C., DE CLEVA, R., ZILBERSTEIN, B. and CECCONELLO, I., 2007. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **22**(4), pp. 464-471.
- BANNERMAN, D.D., PAAPE, M.J., LEE, J.W., ZHAO, X., HOPE, J.C. and RAINARD, P., 2004. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, **11**(3), pp. 463-472.
- BARDANZELLU, F., FANOS, V. and REALI, A., 2017. "Omics" in Human Colostrum and Mature Milk: Looking to Old Data with New Eyes. *Nutrients*, **9**(8), pp. 10.3390/nu9080843.
- BARKEMA, H.W., SCHUKKEN, Y.H. and ZADOKS, R.N., 2006. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of dairy science*, **89**(6), pp. 1877-1895.
- BAUMAN, D.E., MATHER, I.H., WALL, R.J. and LOCK, A.L., 2006. Major advances associated with the biosynthesis of milk. *Journal of dairy science*, **89**(4), pp. 1235-1243.
- BEARFIELD, C., DAVENPORT, E.S., SIVAPATHASUNDARAM, V. and ALLAKER, R.P., 2002. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, **109**(5), pp. 527-533.
- BEASLEY, F.C. and HEINRICHS, D.E., 2010. Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. *Journal of inorganic biochemistry*, **104**(3), pp. 282-288.
- BEASLEY, S.S. and SARIS, P.E., 2004. Nisin-producing *Lactococcus lactis* strains isolated from human milk. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(8), pp. 5051-5053.
- BEGEGA, A., MENDEZ LÓPEZ, M., DE ISCAR, M.J., CUESTA-IZQUIERDO, M., SOLÍS, G., FERNÁNDEZ-COLOMER, B., ÁLVAREZ, L., MENDEZ, M. and ARIAS, J.L., 2010. Assessment of the global intelligence and selective cognitive capacities in preterm 8-year-old children. *Psicothema*, **22**(4), pp. 648-653.
- BEGOVIĆ, J., JOVČIĆ, B., PAPIC-OBRAĐOVIĆ, M., VELJOVIĆ, K., LUKIĆ, J., KOJIC, M. and TOPISIROVIĆ, L., 2013. Genotypic diversity and virulent factors of

- Staphylococcus epidermidis isolated from human breast milk. *Microbiological research*, **168**(2), pp. 77-83.
- BEISCHER, N.A., MACKAY, E.V. and COLDITZ, P.B., 1997. *Obstetrics and the newborn*. Philadelphia (PA): WB Saunders Co.
- BELET, N., HACIOMEROGLU, P. and KUCUKODUK, S., 2004. Ciprofloxacin treatment in newborns with multi-drug-resistant nosocomial *Pseudomonas* infections. *Biology of the neonate*, **85**(4), pp. 263-268.
- BENGMARK, S., 2013. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological research*, **69**(1), pp. 87-113.
- BENOR, S., MAROM, R., BEN TOV, A., ARMONI DOMANY, K., ZAIDENBERG-ISRAELI, G. and DOLLBERG, S., 2014. Probiotic supplementation in mothers of very low birth weight infants. *American Journal of Perinatology*, **31**(6), pp. 497-504.
- BERCOT, B., KANNENGIESSER, C., OUDIN, C., GRANDCHAMP, B., SANSON-LE PORS, M.J., MOULY, S. and ELBIM, C., 2009. First description of NOD2 variant associated with defective neutrophil responses in a woman with granulomatous mastitis related to corynebacteria. *Journal of clinical microbiology*, **47**(9), pp. 3034-3037.
- BERG, R.D., 1995. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends in microbiology*, **3**(4), pp. 149-154.
- BERG, R.D. and GARLINGTON, A.W., 1979. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infection and immunity*, **23**(2), pp. 403-411.
- BERNARDEAU, M., VERNOUX, J.P., HENRI-DUBERNET, S. and GUEGUEN, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International journal of food microbiology*, **126**(3), pp. 278-285.
- BERNI CANANI, R., SANGWAN, N., STEFKA, A.T., NOCERINO, R., PAPARO, L., AITORO, R., CALIGNANO, A., KHAN, A.A., GILBERT, J.A. and NAGLER, C.R., 2016. Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *The ISME journal*, **10**(3), pp. 742-750.
- BERTOTTO, A., GERLI, R., CASTELLUCCI, G., SCALISE, F. and VACCARO, R., 1991. Human milk lymphocytes bearing the gamma/delta T-cell receptor are mostly delta TCS1-positive cells. *Immunology*, **74**(2), pp. 360-361.
- BLACKBURN, D.G., 1993. Lactation: historical patterns and potential for manipulation. *Journal of dairy science*, **76**(10), pp. 3195-3212.
- BLANCO-QUIRÓS, A., ARRANZ, E., SOLÍS, G., VILLAR, A., RAMOS, A. and COTO, D., 2000. Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *European journal of pediatrics*, **159**(6), pp. 420-423.
- BLANK, D., DOTZ, V., GEYER, R. and KUNZ, C., 2012. Human milk oligosaccharides and Lewis blood group: individual high-throughput sample profiling to enhance conclusions from functional studies. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, **3**(3), pp. 440S-9S.
- BODE, L., 2015. The functional biology of human milk oligosaccharides. *Early human development*, **91**(11), pp. 619-622.
- BODE, L., 2012. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, **22**(9), pp. 1147-1162.
- BOER, H.R., ANIDO, G. and MACDONALD, N., 1981. Bacterial colonization of human milk. *Southern medical journal*, **74**(6), pp. 716-718.
- BOIX-AMORÓS, A., COLLADO, M.C. and MIRA, A., 2016. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Frontiers in microbiology*, **7**, pp. 492.
- BOIX-AMORÓS, A., MARTÍNEZ-COSTA, C., QUEROL, A., COLLADO, M.C. and MIRA, A., 2017. Multiple Approaches Detect the Presence of Fungi in Human Breastmilk Samples from Healthy Mothers. *Scientific reports*, **7**(1), pp. 13016-017-13270-x.
- BONNEFONT, C.M., TOUFEER, M., CAUBET, C., FOULON, E., TASCA, C., AUREL, M.R., BERGONIER, D., BOULLIER, S., ROBERT-GRANIE, C., FOUCRAS, G. and RUPP, R., 2011. Transcriptomic analysis of milk somatic cells in mastitis resistant and susceptible sheep upon challenge with *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *BMC genomics*, **12**, pp. 208-2164-12-208.

- BORIS, S., SUÁREZ, J.E., VÁZQUEZ, F. and BARBES, C., 1998. Adherence of human vaginal *Lactobacilli* to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and immunity*, **66**(5), pp. 1985-1989.
- BORRIELLO, S.P., HAMMES, W.P., HOLZAPFEL, W., MARTEAU, P., SCHREZENMEIR, J., VAARA, M. and VALTONEN, V., 2003. Safety of probiotics that contain *Lactobacilli* or bifidobacteria. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **36**(6), pp. 775-780.
- BORRUEL, N., CASELLAS, F., ANTOLIN, M., LLOPIS, M., CAROL, M., ESPIIN, E., NAVAL, J., GUARNER, F. and MALAGELADA, J.R., 2003. Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa. *The American Journal of Gastroenterology*, **98**(4), pp. 865-870.
- BOU, G., CHAVES, F., OLIVER, A. and OTEO, J., 2015. *Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- BOYLE, R.J., ROBINS-BROWNE, R.M. and TANG, M.L., 2006. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *The American Journal of Clinical Nutrition*, **83**(6), pp. 1256-64; quiz 1446-7.
- BRENAUT, P., LEFEVRE, L., RAU, A., LALOE, D., PISONI, G., MORONI, P., BEVILACQUA, C. and MARTIN, P., 2014. Contribution of mammary epithelial cells to the immune response during early stages of a bacterial infection to *Staphylococcus aureus*. *Veterinary research*, **45**, pp. 16-9716-45-16.
- BROWN, S.L., BRIGHT, R.A., DWYER, D.E. and FOXMAN, B., 2005. Breast pump adverse events: reports to the food and drug administration. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **21**(2), pp. 169-174.
- BUDDINGTON, R.K., WILLIAMS, C.H., KOSTEK, B.M., BUDDINGTON, K.K. and KULLEN, M.J., 2010. Maternal-to-infant transmission of probiotics: concept validation in mice, rats, and pigs. *Neonatology*, **97**(3), pp. 250-256.
- BUKOWSKI, M., WLADYKA, B. and DUBIN, G., 2010. Exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. *Toxins*, **2**(5), pp. 1148-1165.
- CABINIAN, A., SINSIMER, D., TANG, M., ZUMBA, O., MEHTA, H., TOMA, A., SANT'ANGELO, D., LAOUAR, Y. and LAOUAR, A., 2016. Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLoS one*, **11**(6), pp. e0156762.
- CABRERA-RUBIO, R., COLLADO, M.C., LAITINEN, K., SALMINEN, S., ISOLAURI, E. and MIRA, A., 2012. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **96**(3), pp. 544-551.
- CABRERA-RUBIO, R., MIRA-PASCUAL, L., MIRA, A. and COLLADO, M.C., 2016. Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. *Journal of developmental origins of health and disease*, **7**(1), pp. 54-60.
- CALVO, J., CANTÓN, R., FERNÁNDEZ, F., MIRELIS, B. and NAVARRO, F., 2011. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. In: E. CERCENADO and R. CANTÓN, eds, *Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2ª Edición edn. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- CAMPEOTTO, F., SUAUE, A., KAPEL, N., MAGNE, F., VIALLO, V., FERRARIS, L., WALIGORA-DUPRIET, A.J., SOULAINES, P., LEROUX, B., KALACH, N., DUPONT, C. and BUTEL, M.J., 2011. A fermented formula in pre-term infants: clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. *The British journal of nutrition*, **105**(12), pp. 1843-1851.
- CANNON, A.M., KAKULAS, F., HEPWORTH, A.R., LAI, C.T., HARTMANN, P.E. and GEDDES, D.T., 2015. The Effects of Leptin on Breastfeeding Behaviour. *International journal of environmental research and public health*, **12**(10), pp. 12340-12355.
- CÁRDENAS, N., CALZADA, J., PEIROTEN, A., JIMÉNEZ, E., ESCUDERO, R., RODRÍGUEZ, J.M., MEDINA, M. and FERNÁNDEZ, L., 2014. Development of a potential probiotic fresh cheese using two *Lactobacillus salivarius* strains isolated from human milk. *BioMed research international*, **2014**, pp. 801918.



- CÁRDENAS, N., LAINO, J.E., DELGADO, S., JIMÉNEZ, E., JUÁREZ DEL VALLE, M., SAVOY DE GIORI, G., SESMA, F., MAYO, B., FERNÁNDEZ, L., LEBLANC, J.G. and RODRÍGUEZ, J.M., 2015. Relationships between the genome and some phenotypical properties of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**(10), pp. 4343-4353.
- CARIO, E., 2005. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*, **54**(8), pp. 1182-1193.
- CARMICHAEL, A.R. and DIXON, J.M., 2002. Is lactation mastitis and shooting breast pain experienced by women during lactation caused by *Candida albicans*? *Breast (Edinburgh, Scotland)*, **11**(1), pp. 88-90.
- CARRERA, M., ARROYO, R., MEDIANO, P., FERNÁNDEZ, L., MARÍN, M. and RODRÍGUEZ, J.M., 2012. Lactancia materna y mastitis. Tratamiento empírico basado en la sintomatología y los agentes etiológicos. *Acta Pediatr Esp*, **70**(6), pp. 255-261.
- CASADEVALL, A. and PIROFSKI, L.A., 2003. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, **1**(1), pp. 17-24.
- CAZZOLA, M., PHAM-THI, N., KERIHUEL, J.C., DURAND, H. and BOHBOT, S., 2010. Efficacy of a symbiotic supplementation in the prevention of common winter diseases in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study. *Therapeutic advances in respiratory disease*, **4**(5), pp. 271-278.
- CAZZOLA, M., TOMPKINS, T.A. and MATERA, M.G., 2010. Immunomodulatory impact of a symbiotic in T(h)1 and T(h)2 models of infection. *Therapeutic advances in respiratory disease*, **4**(5), pp. 259-270.
- CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L. and COLLINS, J.K., 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, **84**(5), pp. 759-768.
- CHENG, J., RINGEL-KULKA, T., HEIKAMP-DE JONG, I., RINGEL, Y., CARROLL, I., DE VOS, W.M., SALOJARVI, J. and SATOKARI, R., 2016. Discordant temporal development of bacterial phyla and the emergence of core in the fecal microbiota of young children. *The ISME journal*, **10**(4), pp. 1002-1014.
- CHERUKURI, A., ROTHSTEIN, D.M., CLARK, B., CARTER, C.R., DAVISON, A., HERNÁNDEZ-FUENTES, M., HEWITT, E., SALAMA, A.D. and BAKER, R.J., 2014. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF-alpha expression ratio in regulatory B cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, **25**(7), pp. 1575-1585.
- CHIRICO, G., MARZOLLO, R., CORTINOVIS, S., FONTE, C. and GASPARONI, A., 2008. Antiinfective properties of human milk. *The Journal of nutrition*, **138**(9), pp. 1801S-1806S.
- CHOURAQUI, J.P., GRATHWOHL, D., LABAUNE, J.M., HASCOET, J.M., DE MONTGOLFIER, I., LECLAIRE, M., GIARRE, M. and STEENHOUT, P., 2008. Assessment of the safety, tolerance, and protective effect against diarrhea of infant formulas containing mixtures of probiotics or probiotics and prebiotics in a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **87**(5), pp. 1365-1373.
- CLEMENTE, J.C., PEHRSSON, E.C., BLASER, M.J., SANDHU, K., GAO, Z., WANG, B., MAGRIS, M., HIDALGO, G., CONTRERAS, M., NOYA-ALARCÓN, O., LANDER, O., MCDONALD, J., COX, M., WALTER, J., OH, P.L., RUIZ, J.F., RODRÍGUEZ, S., SHEN, N., SONG, S.J., METCALF, J., KNIGHT, R., DANTAS, G. and DOMÍNGUEZ-BELLO, M.G., 2015. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Science advances*, **1**(3), pp. e1500183.
- COLLADO, M.C., DELGADO, S., MALDONADO, A. and RODRÍGUEZ, J.M., 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Letters in applied microbiology*, **48**(5), pp. 523-528.
- COLLADO, M.C., LAITINEN, K., SALMINEN, S. and ISOLAURI, E., 2012. Maternal weight and excessive weight gain during pregnancy modify the immunomodulatory potential of breast milk. *Pediatric research*, **72**(1), pp. 77-85.
- COLLADO, M.C., SANTAELLA, M., MIRAPASCUAL, L., MARTÍNEZ-ARIAS, E., KHODAYAR-PARDO, P., ROS, G. and MARTINEZ-COSTA, C., 2015.

- Longitudinal Study of Cytokine Expression, Lipid Profile and Neuronal Growth Factors in Human Breast Milk from Term and Preterm Deliveries. *Nutrients*, **7**(10), pp. 8577-8591.
- COLLINS, S. and REID, G., 2016. Distant Site Effects of Ingested Prebiotics. *Nutrients*, **8**(9), pp. 10.3390/nu8090523.
- COLLINS, S.M., SURETTE, M. and BERCIK, P., 2012. The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature reviews. Microbiology*, **10**(11), pp. 735-742.
- CONG, X., XU, W., ROMISHER, R., POVEDA, S., FORTE, S., STARKWEATHER, A. and HENDERSON, W.A., 2016. Gut Microbiome and Infant Health: Brain-Gut-Microbiota Axis and Host Genetic Factors. *The Yale journal of biology and medicine*, **89**(3), pp. 299-308.
- CONNOLLY, E. and LÖNNERDAL, B., 2003. d(-)-lactic acid-producing bacteria: safe to use in infant formulas. *Nutrafoods*, **3**, pp. 37-49.
- CONNOLLY, E., ABRAHAMSSON, T. and BJORKSTEN, B., 2005. Safety of D(-)-lactic acid producing bacteria in the human infant. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **41**(4), pp. 489-492.
- CONTRERAS, G.A. and RODRÍGUEZ, J.M., 2011. Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **16**(4), pp. 339-356.
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S. and GREENBERG, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, **284**(5418), pp. 1318-1322.
- CREMONESI, P., CAPOFERRI, R., PISONI, G., DEL CORVO, M., STROZZI, F., RUPP, R., CAILLAT, H., MODESTO, P., MORONI, P., WILLIAMS, J.L., CASTIGLIONI, B. and STELLA, A., 2012. Response of the goat mammary gland to infection with *Staphylococcus aureus* revealed by gene expression profiling in milk somatic and white blood cells. *BMC genomics*, **13**, pp. 540-2164-13-540.
- CRITCHFIELD, J.W., VAN HEMERT, S., ASH, M., MULDER, L. and ASHWOOD, P., 2011. The potential role of probiotics in the management of childhood autism spectrum disorders. *Gastroenterology research and practice*, **2011**, pp. 161358.
- CRONIN, M., MORRISSEY, D., RAJENDRAN, S., EL MASHAD, S.M., VAN SINDEREN, D., O'SULLIVAN, G.C. and TANGNEY, M., 2010. Orally administered bifidobacteria as vehicles for delivery of agents to systemic tumors. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, **18**(7), pp. 1397-1407.
- DABROWSKA, K. and WITKIEWICZ, W., 2016. Correlations of Host Genetics and Gut Microbiome Composition. *Frontiers in microbiology*, **7**, pp. 1357.
- DANINO, T., PRINDLE, A., KWONG, G.A., SKALAK, M., LI, H., ALLEN, K., HASTY, J. and BHATIA, S.N., 2015. Programmable probiotics for detection of cancer in urine. *Science translational medicine*, **7**(289), pp. 289ra84.
- DASANAYAKE, A.P., LI, Y., WIENER, H., RUBY, J.D. and LEE, M.J., 2005. Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *Journal of periodontology*, **76**(2), pp. 171-177.
- DAUDI, N., SHOUVAL, D., STEIN-ZAMIR, C. and ACKERMAN, Z., 2012. Breastmilk hepatitis A virus RNA in nursing mothers with acute hepatitis A virus infection. *Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, **7**, pp. 313-315.
- DAVE, V., STREET, K., FRANCIS, S., BRADMAN, A., RILEY, L., ESKENAZI, B. and HOLLAND, N., 2016. Bacterial microbiome of breast milk and child saliva from low-income Mexican-American women and children. *Pediatric research*, **79**(6), pp. 846-854.
- DAVID, M.Z. and DAUM, R.S., 2017. Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections. *Current topics in microbiology and immunology*, .
- DAVIS, L.S., 2013, 2 enero 2013. Is the Medical Community Failing Breastfeeding Moms?. *Times*.
- DE GREEFF, A., ZADOKS, R., RUULS, L., TOUSSAINT, M., NGUYEN, T.K., DOWNING, A., REBEL, J., STOCKHOFF-ZURWIEDEN, N. and SMITH, H., 2013. Early host response in the mammary gland after experimental *Streptococcus uberis* challenge in heifers. *Journal of dairy science*, **96**(6), pp. 3723-3736.
- DE VOS, W.M., 2013. Fame and future of faecal transplantations--developing next-generation

- therapies with synthetic microbiomes. *Microbial biotechnology*, **6**(4), pp. 316-325.
- DE WEERTH, C., FUENTES, S. and DE VOS, W.M., 2013a. Crying in infants: on the possible role of intestinal microbiota in the development of colic. *Gut microbes*, **4**(5), pp. 416-421.
- DE WEERTH, C., FUENTES, S., PUYLAERT, P. and DE VOS, W.M., 2013b. Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics*, **131**(2), pp. e550-8.
- DEGHORAIN, M. and VAN MELDEREN, L., 2012. The Staphylococci phages family: an overview. *Viruses*, **4**(12), pp. 3316-3335.
- DEKKER, J., COLLETT, M., PRASAD, J. and GOPAL, P., 2007. Functionality of probiotics - potential for product development. *Forum of nutrition*, **60**, pp. 196-208.
- DELGADO, S., ARROYO, R., JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2009a. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (I). *Acta Pediatr Esp.*, **67**(2), pp. 77-84.
- DELGADO, S., GARCÍA-GARROTE, F., PADILLA, B., RODRÍGUEZ, J.M. and ROMERO, B., 2015. Diagnóstico microbiológico de la infección bacteriana asociada al parto y al puerperio. In: SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y MICROBIOLOGÍA CLÍNICA (SEIMC), ed, *Procedimientos en Microbiología Clínica*.
- DELGADO, S., ARROYO, R., JIMÉNEZ, E., MARÍN, M.L., DEL CAMPO, R., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2009b. *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from breast milk of women suffering infectious mastitis: potential virulence traits and resistance to antibiotics. *BMC microbiology*, **9**, pp. 82-2180-9-82.
- DELGADO, S., ARROYO, R., MARTÍN, R. and RODRÍGUEZ, J.M., 2008. PCR-DGGE assessment of the bacterial diversity of breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC infectious diseases*, **8**, pp. 51-2334-8-51.
- DELGADO, S., COLLADO, M.C., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2009. Bacterial analysis of breast milk: a tool to differentiate Raynaud's phenomenon from infectious mastitis during lactation. *Current microbiology*, **59**(1), pp. 59-64.
- DELGADO, S., GARCÍA, P., FERNÁNDEZ, L., JIMÉNEZ, E., RODRÍGUEZ-BANOS, M., DEL CAMPO, R. and RODRÍGUEZ, J.M., 2011. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains involved in human and bovine mastitis. *FEMS immunology and medical microbiology*, **62**(2), pp. 225-235.
- DELPLANQUE, B., GIBSON, R., KOLETZKO, B., LAPILLONNE, A. and STRANDVIK, B., 2015. Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **61**(1), pp. 8-17.
- DETHLEFSEN, L., MCFALL-NGAI, M. and RELMAN, D.A., 2007. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature*, **449**(7164), pp. 811-818.
- DEVIRGILIIS, C., ZINNO, P. and PEROZZI, G., 2013. Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Frontiers in Microbiology*, **4**, pp. 10.3389/fmicb.2013.00301.
- DI DOMENICO, E.G., TOMA, L., PRIGNANO, G., PELAGALLI, L., POLICE, A., CAVALLOTTI, C., TORELLI, R., SANGUINETTI, M. and ENSOLI, F., 2015. Misidentification of *Streptococcus uberis* as a human pathogen: a case report and literature review. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, **33**, pp. 79-81.
- DI MAURO, A., NEU, J., RIEZZO, G., RAIMONDI, F., MARTINELLI, D., FRANCAVILLA, R. and INDRIO, F., 2013. Gastrointestinal function development and microbiota. *Italian journal of pediatrics*, **39**, pp. 15-7288-39-15.
- DIEKEMA, D.J., PFALLER, M.A., SCHMITZ, F.J., SMAYEVSKY, J., BELL, J., JONES, R.N., BEACH, M. and SENTRY PARTICIPANTS GROUP, 2001. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **32 Suppl 2**, pp. S114-32.

- DIGIULIO, D.B., ROMERO, R., AMOGAN, H.P., KUSANOVIC, J.P., BIK, E.M., GOTSCH, F., KIM, C.J., EREZ, O., EDWIN, S. and RELMAN, D.A., 2008. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PloS one*, **3**(8), pp. e3056.
- DINAN, T.G. and CRYAN, J.F., 2015. The impact of gut microbiota on brain and behaviour: implications for psychiatry. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, **18**(6), pp. 552-558.
- DINAN, T.G., STILLING, R.M., STANTON, C. and CRYAN, J.F., 2015. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior. *Journal of psychiatric research*, **63**, pp. 1-9.
- DINESH, K., VERMA, A., DAS GUPTA, I., THAKUR, Y.P., VERMA, N. and ARYA, A., 2015. Identification of polymorphism in exons 7 and 12 of lactoferrin gene and its association with incidence of clinical mastitis in Murrah buffalo. *Tropical animal health and production*, **47**(4), pp. 643-647.
- DOMINGUEZ-BELLO, M.G. and BLASER, M.J., 2008. Do you have a probiotic in your future? *Microbes and Infection*, **10**(9), pp. 1072-1076.
- DONOVAN, S., 2008. Human milk: nutritional properties. In: C. DUGGAN, J. WATKINS and W. WALKER, eds, *Nutrition in Pediatrics 4. Basic Science, Clinical Applications*. Ontario, Canada: BC Decker Inc, pp. 341-353.
- DOPHEIDE, J.F., KNOPF, P., ZELLER, G.C., VOSSELER, M., ABEGUNWARDENE, N., MUNZEL, T. and ESPINOLA-KLEIN, C., 2015. Low IL-10/TNFalpha ratio in patients with coronary artery disease and reduced left ventricular ejection fraction with a poor prognosis after 10 years. *Inflammation*, **38**(2), pp. 911-922.
- DORÉ, J. and CORTIER, G., 2010. The human intestinal microbiota. *Gastroenterologie clinique et biologique*, **34 Suppl 1**, pp. S7-15.
- DOUCET, S., SOUSSIGNAN, R., SAGOT, P. and SCHAAAL, B., 2009. The secretion of areolar (Montgomery's) glands from lactating women elicits selective, unconditional responses in neonates. *PloS one*, **4**(10), pp. e7579.
- DOUILLARD, F.P. and DE VOS, W.M., 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microbial cell factories*, **13 Suppl 1**, pp. S8-2859-13-S1-S8. Epub 2014 Aug 29.
- DROSSOU-AGAKIDOU, V., ROILIDES, E., PAPAKYRIAKIDOU-KOLIOUSKA, P., AGAKIDIS, C., NIKOLAIDES, N., SARAFIDIS, K. and KREMEPOPOULOS, G., 2004. Use of ciprofloxacin in neonatal sepsis: lack of adverse effects up to one year. *The Pediatric infectious disease journal*, **23**(4), pp. 346-349.
- DUC LE, H., HONG, H.A., BARBOSA, T.M., HENRIQUES, A.O. and CUTTING, S.M., 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(4), pp. 2161-2171.
- DUGUID, I.G., EVANS, E., BROWN, M.R. and GILBERT, P., 1992. Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **30**(6), pp. 803-810.
- DUPONT-ROUZEYROL, M., BIRON, A., O'CONNOR, O., HUGUON, E. and DESCLOUX, E., 2016. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet (London, England)*, **387**(10023), pp. 1051-6736(16)00624-3. Epub 2016 Mar 2.
- DURANTI, S., LUGLI, G.A., MANCABELLI, L., ARMANINI, F., TURRONI, F., JAMES, K., FERRETTI, P., GORFER, V., FERRARIO, C., MILANI, C., MANGIFESTA, M., ANZALONE, R., ZOLFO, M., VIAPPANI, A., PASOLLI, E., BARILETTI, I., CANTO, R., CLEMENTI, R., COLOGNA, M., CRIFO, T., CUSUMANO, G., FEDI, S., GOTTARDI, S., INNAMORATI, C., MASE, C., POSTAL, D., SAVOI, D., SOFFIATI, M., TATEO, S., PEDROTTI, A., SEGATA, N., VAN SINDEREN, D. and VENTURA, M., 2017a. Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission. *Microbiome*, **5**(1), pp. 66-017-0282-6.
- DURANTI, S., LUGLI, G.A., MANCABELLI, L., TURRONI, F., MILANI, C., MANGIFESTA, M., FERRARIO, C., ANZALONE, R., VIAPPANI, A., VAN SINDEREN, D. and VENTURA, M., 2017b. Prevalence of Antibiotic Resistance Genes among Human Gut-Derived Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**(3), pp. 10.1128/AEM.02894-16. Print 2017 Feb 1.

- DUTTA, S., CHOWDHARY, G., KUMAR, P., MUKHOPADHAY, K. and NARANG, A., 2006. Ciprofloxacin administration to very low birth weight babies has no effect on linear growth in infancy. *Journal of tropical pediatrics*, **52**(2), pp. 103-106.
- EATON, T.J. and GASSON, M.J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4), pp. 1628-1635.
- ECHARRI, P.P., GRACIA, C.M., BERRUEZO, G.R., VIVES, I., BALLESTA, M., SOLÍS, G., MORILLAS, I.V., REYES-GAVILÁN, C.G., MARGOLLES, A. and GUEIMONDE, M., 2011. Assessment of intestinal microbiota of full-term breast-fed infants from two different geographical locations. *Early human development*, **87**(7), pp. 511-513.
- EDWARDS, C.A. and PARRETT, A.M., 2002. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. *The British journal of nutrition*, **88** Suppl 1, pp. S11-8.
- EFSA BIOHAZ PANEL, 2013. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, **11**(11), pp. 3449-n/a.
- EFSA FEEDAP PANEL, 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, **10**(6), pp. 2740-n/a.
- EFSA ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA), 2011. Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA Journal*, **9**(4), pp. 1984-n/a.
- EIDELMAN, A.I. and SZILAGYI, G., 1979. Patterns of bacterial colonization of human milk. *Obstetrics and gynecology*, **53**(5), pp. 550-552.
- EL AIDY, S., DINAN, T.G. and CRYAN, J.F., 2015. Gut Microbiota: The Conductor in the Orchestra of Immune-Neuroendocrine Communication. *Clinical therapeutics*, **37**(5), pp. 954-967.
- EL AIDY, S., VAN DEN BOGERT, B. and KLEEREBEZEM, M., 2015. The small intestine microbiota, nutritional modulation and relevance for health. *Current opinion in biotechnology*, **32**, pp. 14-20.
- ESPINOSA-MARTOS, I., JIMÉNEZ, E., DE ANDRÉS, J., RODRÍGUEZ-ALCALA, L.M., TAVAREZ, S., MANZANO, S., FERNÁNDEZ, L., ALONSO, E., FONTECHA, J. and RODRÍGUEZ, J.M., 2016. Milk and blood biomarkers associated to the clinical efficacy of a probiotic for the treatment of infectious mastitis. *Beneficial microbes*, **7**(3), pp. 305-318.
- EXPERT CONSULTATION ON EVALUATION OF HEALTH FAO/WHO, 2001. *Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria: Report of a Joint FAO WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*.
- FAN, Y., CHONG, Y.S., CHOOLANI, M.A., CREGAN, M.D. and CHAN, J.K., 2010. Unravelling the mystery of stem/progenitor cells in human breast milk. *PloS one*, **5**(12), pp. e14421.
- FAO/WHO, 2002. *Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*.
- FARIA, A.M. and WEINER, H.L., 2006. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflammation & allergy drug targets*, **5**(3), pp. 179-190.
- FAVIER, C.F., DE VOS, W.M. and AKKERMANS, A.D., 2003. Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe*, **9**(5), pp. 219-229.
- FAVIER, C.F., VAUGHAN, E.E., DE VOS, W.M. and AKKERMANS, A.D., 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(1), pp. 219-226.
- FERNÁNDEZ, A., GARCÍA, C., SÁEZ, J.A. and VALDEZATE, S., 2010. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. In: E. CERCENADO and R. CANTÓN, eds, *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2ª Edición edn. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).

- FERNÁNDEZ, L., ARROYO, R., CÁRDENAS, N., CARRERA, M., DE ANDRÉS, J., DELGADO, S., ESCUDER, D., ESPINOSA-MARTOS, I., GÓMEZ, M., GÓMEZ DE SEGURA, A., JIMÉNEZ, E., LANGA, S., MALDONADO, A., MARÍN, M.L., MARTÍN, I., MARTÍN, R., MARTÍN, V., MEDIANO, P., MOLES, L., RODRÍGUEZ-ARBOLEYA, B., SOTO, A.M., VILLAR, M.A. and RODRÍGUEZ, J.M., 2014a. *Mastitis, el lado oscuro de la lactancia. Microbiota mamaria: de la fisiología a las mastitis*. Madrid: Probisearch S.L.
- FERNÁNDEZ, L., ARROYO, R., ESPINOSA, I., MARÍN, M., JIMÉNEZ, E. and RODRÍGUEZ, J.M., 2014b. Probiotics for human lactational mastitis. *Beneficial microbes*, **5**(2), pp. 169-183.
- FERNÁNDEZ, L., CÁRDENAS, N., ARROYO, R., MANZANO, S., JIMÉNEZ, E., MARTÍN, V. and RODRÍGUEZ, J.M., 2016. Prevention of Infectious Mastitis by Oral Administration of *Lactobacillus salivarius* PS2 During Late Pregnancy. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **62**(5), pp. 568-573.
- FERNÁNDEZ, L., LANGA, S., MARTÍN, V., JIMÉNEZ, E., MARTÍN, R. and RODRÍGUEZ, J.M., 2013a. The microbiota of human milk in healthy women. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, **59**(1), pp. 31-42.
- FERNÁNDEZ, L., LANGA, S., MARTÍN, V., MALDONADO, A., JIMÉNEZ, E., MARTÍN, R. and RODRÍGUEZ, J.M., 2013b. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological research*, **69**(1), pp. 1-10.
- FICHOROVA, R.N., ONDERDONK, A.B., YAMAMOTO, H., DELANEY, M.L., DUBOIS, A.M., ALLRED, E., LEVITON, A. and EXTREMELY LOW GESTATION AGE NEWBORNS (ELGAN) STUDY INVESTIGATORS, 2011. Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. *mBio*, **2**(1), pp. e00280-10.
- FIELD, C.J., 2005. The immunological components of human milk and their effect on immune development in infants. *The Journal of nutrition*, **135**(1), pp. 1-4.
- FIELDS, D.A., SCHNEIDER, C.R. and PAVELA, G., 2016. A narrative review of the associations between six bioactive components in breast milk and infant adiposity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, **24**(6), pp. 1213-1221.
- FISCHER, M., SPIES-WEISSHART, B., SCHRENK, K., GRUHN, B., WITTIG, S., GLASER, A., HOCHHAUS, A., SCHOLL, S. and SCHNETZKE, U., 2016. Polymorphisms of Dectin-1 and TLR2 Predispose to Invasive Fungal Disease in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *PloS one*, **11**(3), pp. e0150632.
- FITZSTEVENS, J.L., SMITH, K.C., HAGADORN, J.I., CAIMANO, M.J., MATSON, A.P. and BROWNELL, E.A., 2017. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutrition in clinical practice: official publication of the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*, **32**(3), pp. 354-364.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO WHO), 2006. *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Roma.
- FOSTER, W.D. and HARRIS, R.E., 1960. The incidence of *Staphylococcus pyogenes* in normal human breast milk. *The Journal of obstetrics and gynaecology of the British Empire*, **67**, pp. 463-464.
- FOUHY, F., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F., STANTON, C. and COTTER, P.D., 2012. Composition of the early intestinal microbiota: knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut microbes*, **3**(3), pp. 203-220.
- FRANCA, A., CARVALHAIS, V., MAIRALITRAN, T., VILANOVA, M., CERCA, N. and PIER, G., 2014. Alterations in the *Staphylococcus epidermidis* biofilm transcriptome following interaction with whole human blood. *Pathogens and disease*, **70**(3), pp. 444-448.
- FRANKS, A.H., HARMSSEN, H.J., RAANGS, G.C., JANSEN, G.J., SCHUT, F. and WELLING, G.W., 1998. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(9), pp. 3336-3345.
- FRANZ, C.M., MUSCHOLL-SILBERHORN, A.B., YOUSIF, N.M., VANCANNEYT, M., SWINGS, J. and HOLZAPFEL, W.H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic



resistance among Enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(9), pp. 4385-4389.

- FU, Y., ZHOU, E., LIU, Z., LI, F., LIANG, D., LIU, B., SONG, X., ZHAO, F., FEN, X., LI, D., CAO, Y., ZHANG, X., ZHANG, N. and YANG, Z., 2013. Staphylococcus aureus and Escherichia coli elicit different innate immune responses from bovine mammary epithelial cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, **155**(4), pp. 245-252.
- FUNKHOUSER, L.J. and BORDENSTEIN, S.R., 2013. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS biology*, **11**(8), pp. e1001631.
- GAHAN, C.G., 2012. The bacterial lux reporter system: applications in bacterial localisation studies. *Current gene therapy*, **12**(1), pp. 12-19.
- GAO, J.W., ZHANG, A.Q., WANG, X., LI, Z.Y., YANG, J.H., ZENG, L., GU, W. and JIANG, J.X., 2015. Association between the TLR2 Arg753Gln polymorphism and the risk of sepsis: a meta-analysis. *Critical Care (London, England)*, **19**, pp. 416-015-1130-3.
- GARCÍA-LECHUZ, J.M., GONZÁLEZ, J.J., ORTA, N. and SÁNCHEZ, M.I., 2017. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología, 1b. In: E. CERCENADO and R. CANTÓN, eds, *Procedimientos en Microbiología Clínica*. 2ª Edición edn. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).
- GAROFALO, R., 2010. Cytokines in human milk. *The Journal of pediatrics*, **156**(2 Suppl), pp. S36-40.
- GEPHART, S.M. and WELLER, M., 2014. Colostrum as oral immune therapy to promote neonatal health. *Advances in neonatal care: official journal of the National Association of Neonatal Nurses*, **14**(1), pp. 44-51.
- GIDREWICZ, D.A. and FENTON, T.R., 2014. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC pediatrics*, **14**, pp. 216-2431-14-216.
- GILL, S.R., FOUTS, D.E., ARCHER, G.L., MONGODIN, E.F., DEBOY, R.T., RAVEL, J., PAULSEN, I.T., KOLONAY, J.F., BRINKAC, L., BEANAN, M., DODSON, R.J., DAUGHERTY, S.C., MADUPU, R., ANGIUOLI, S.V., DURKIN, A.S., HAFT, D.H., VAMATHEVAN, J., KHOURI, H., UTTERBACK, T., LEE, C., DIMITROV, G., JIANG, L., QIN, H., WEIDMAN, J., TRAN, K., KANG, K., HANCE, I.R., NELSON, K.E. and FRASER, C.M., 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. *Journal of Bacteriology*, **187**(7), pp. 2426-2438.
- GILL, S.R., POP, M., DEBOY, R.T., ECKBURG, P.B., TURNBAUGH, P.J., SAMUEL, B.S., GORDON, J.I., RELMAN, D.A., FRASER-LIGGETT, C.M. and NELSON, K.E., 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, **312**(5778), pp. 1355-1359.
- GIORDANO, N., SENESI, M., BATTISTI, E., PALUMBO, F., MONDILLO, S., BARGAGLI, G., PALAZZUOLI, V., NARDI, P. and GENNARI, C., 1996. Reactive arthritis by Staphylococcus epidermidis: report of an unusual case. *Clinical rheumatology*, **15**(1), pp. 59-61.
- GOEHRING, K.C., KENNEDY, A.D., PRIETO, P.A. and BUCK, R.H., 2014. Direct evidence for the presence of human milk oligosaccharides in the circulation of breastfed infants. *PloS one*, **9**(7), pp. e101692.
- GOLDENBERG, R.L., CULHANE, J.F., IAMS, J.D. and ROMERO, R., 2008. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet (London, England)*, **371**(9606), pp. 75-84.
- GOMEZ-GALLEGO, C., GARCIA-MANTRANA, I., SALMINEN, S. and COLLADO, M.C., 2016. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, **21**(6), pp. 400-405.
- GÓMEZ-GALLEGO, C., KUMAR, H., GARCÍA-MANTRANA, I., DU TOIT, E., SUOMELA, J.P., LINDERBORG, K.M., ZHANG, Y., ISOLAURI, E., YANG, B., SALMINEN, S. and COLLADO, M.C., 2017. Breast Milk Polyamines and Microbiota Interactions: Impact of Mode of Delivery and Geographical Location. *Annals of Nutrition & Metabolism*, **70**(3), pp. 184-190.
- GONZÁLEZ, R., MALDONADO, A., MARTÍN, V., MANDOMANDO, I., FUMADO, V., METZNER, K.J., SACOOR, C., FERNÁNDEZ, L., MACETE, E., ALONSO,

- P.L., RODRÍGUEZ, J.M. and MENENDEZ, C., 2013. Breast milk and gut microbiota in African mothers and infants from an area of high HIV prevalence. *PloS one*, **8**(11), pp. e80299.
- GOODING, M.J., FINLAY, J., SHIPLEY, J.A., HALLIWELL, M. and DUCK, F.A., 2010. Three-dimensional ultrasound imaging of mammary ducts in lactating women: a feasibility study. *Journal of ultrasound in medicine: official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, **29**(1), pp. 95-103.
- GOSALBES, M.J., LLOP, S., VALLES, Y., MOYA, A., BALLESTER, F. and FRANCINO, M.P., 2013. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **43**(2), pp. 198-211.
- GOUGH, E., SHAIKH, H. and MANGES, A.R., 2011. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **53**(10), pp. 994-1002.
- GRAHN, N., OLOFSSON, M., ELLNEBO-SVEDLUND, K., MONSTEIN, H.J. and JONASSON, J., 2003. Identification of mixed bacterial DNA contamination in broad-range PCR amplification of 16S rDNA V1 and V3 variable regions by pyrosequencing of cloned amplicons. *FEMS microbiology letters*, **219**(1), pp. 87-91.
- GREENWOOD, C., MORROW, A.L., LAGOMARCINO, A.J., ALTAYE, M., TAFT, D.H., YU, Z., NEWBURG, D.S., WARD, D.V. and SCHIBLER, K.R., 2014. Early empiric antibiotic use in preterm infants is associated with lower bacterial diversity and higher relative abundance of Enterobacter. *The Journal of pediatrics*, **165**(1), pp. 23-29.
- GREER, L.F., 3rd and SZALAY, A.A., 2002. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence: the journal of biological and chemical luminescence*, **17**(1), pp. 43-74.
- GRENOV, B., BRIEND, A., SANGILD, P.T., THYMAN, T., RYTTER, M.H., HOTHER, A.L., MOLGAARD, C. and MICHAELSEN, K.F., 2016. Undernourished Children and Milk Lactose. *Food and nutrition bulletin*, **37**(1), pp. 85-99.
- GRONLUND, M.M., GUEIMONDE, M., LAITINEN, K., KOCIUBINSKI, G., GRONROOS, T., SALMINEN, S. and ISOLAURI, E., 2007. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **37**(12), pp. 1764-1772.
- GUARNER, F., 2003. Microecology as a target for therapeutic intervention in inflammatory bowel disease. *IDrugs: the investigational drugs journal*, **6**(9), pp. 868-873.
- GUARNER, F. and MALAGELADA, J.R., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet (London, England)*, **361**(9356), pp. 512-519.
- GUARNER, F., REQUENA, T. and MARCOS, A., 2010. Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific evidence". *Nutricion hospitalaria*, **25**(5), pp. 700-704.
- GUEIMONDE, M., BOTTACINI, F., VAN SINDEREN, D., VENTURA, M., MARGOLLES, A. and SÁNCHEZ, B., 2012. Genome sequence of *Parascardovia denticolens* IPLA 20019, isolated from human breast milk. *Journal of Bacteriology*, **194**(17), pp. 4776-4777.
- GUEIMONDE, M., LAITINEN, K., SALMINEN, S. and ISOLAURI, E., 2007. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, **92**(1), pp. 64-66.
- GUPTA, P.H., PATEL, N.A., RANK, D.N. and JOSHI, C.G., 2015. Genetic polymorphism of toll-like receptors 4 gene by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms, polymerase chain reaction-single-strand conformational polymorphism to correlate with mastitic cows. *Veterinary world*, **8**(5), pp. 615-620.
- GURPINAR, A.N., BALKAN, E., KILIC, N., KIRISTIOGLU, I. and DOGRUYOL, H., 1997. The effects of a fluoroquinolone on the growth and development of infants. *The Journal of international medical research*, **25**(5), pp. 302-306.

- HALE, T.W., BATEMAN, T.L., FINKELMAN, M.A. and BERENS, P.D., 2009. The absence of *Candida albicans* in milk samples of women with clinical symptoms of ductal candidiasis. *Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, **4**(2), pp. 57-61.
- HALEY, K.P. and SKAAR, E.P., 2012. A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes and Infection*, **14**(3), pp. 217-227.
- HAMMER, N.D. and SKAAR, E.P., 2011. Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* iron acquisition. *Annual Review of Microbiology*, **65**, pp. 129-147.
- HAMMOND, K.A., 1997. Adaptation of the maternal intestine during lactation. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **2**(3), pp. 243-252.
- HARDY, H., HARRIS, J., LYON, E., BEAL, J. and FOEY, A.D., 2013. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*, **5**(6), pp. 1869-1912.
- HART, A.L., LAMMERS, K., BRIGIDI, P., VITALI, B., RIZZELLO, F., GIONCHETTI, P., CAMPIERI, M., KAMM, M.A., KNIGHT, S.C. and STAGG, A.J., 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, **53**(11), pp. 1602-1609.
- HASCHKE-BECHER, E., BRUNSER, O., CRUCHET, S., GOTTELAND, M., HASCHKE, F. and BACHMANN, C., 2008. Urinary D-lactate excretion in infants receiving *Lactobacillus johnsonii* with formula. *Annals of Nutrition & Metabolism*, **53**(3-4), pp. 240-244.
- HASSIOTOU, F. and GEDDES, D., 2013. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical anatomy (New York, N.Y.)*, **26**(1), pp. 29-48.
- HASSIOTOU, F. and GEDDES, D.T., 2015. Immune cell-mediated protection of the mammary gland and the infant during breastfeeding. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, **6**(3), pp. 267-275.
- HE, C., SHAN, Y. and SONG, W., 2015. Targeting gut microbiota as a possible therapy for diabetes. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, **35**(5), pp. 361-367.
- HENNEQUIN, C., KAUFFMANN-LACROIX, C., JOBERT, A., VIARD, J.P., RICOUR, C., JACQUEMIN, J.L. and BERCHE, P., 2000. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **19**(1), pp. 16-20.
- HENNET, T. and BORSIG, L., 2016. Breastfed at Tiffany's. *Trends in biochemical sciences*, **41**(6), pp. 508-518.
- HEVIA, A., DELGADO, S., SÁNCHEZ, B. and MARGOLLES, A., 2015. Molecular Players Involved in the Interaction Between Beneficial Bacteria and the Immune System. *Frontiers in microbiology*, **6**, pp. 1285.
- HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G.R., MERENSTEIN, D.J., POT, B., MORELLI, L., CANANI, R.B., FLINT, H.J., SALMINEN, S., CALDER, P.C. and SANDERS, M.E., 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, **11**(8), pp. 506-514.
- HILL, D.R. and NEWBURG, D.S., 2015. Clinical applications of bioactive milk components. *Nutrition reviews*, **73**(7), pp. 463-476.
- HIRAMATSU, K., CUI, L., KURODA, M. and ITO, T., 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, **9**(10), pp. 486-493.
- HOASHI, M., MECHE, L., MAHAL, L.K., BAKACS, E., NARDELLA, D., NAFTOLIN, F., BAR-YAM, N. and DOMÍNGUEZ-BELLO, M.G., 2016. Human Milk Bacterial and Glycosylation Patterns Differ by Delivery Mode. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, **23**(7), pp. 902-907.
- HODGE, G., HODGE, S., HASLAM, R., MCPHEE, A., SEPÚLVEDA, H., MORGAN, E., NICHOLSON, I. and ZOLA, H., 2004. Rapid simultaneous measurement of multiple cytokines using 100 microl sample volumes-association with neonatal sepsis. *Clinical and experimental immunology*, **137**(2), pp. 402-407.
- HOLMES, M.A. and ZADOKS, R.N., 2011. Methicillin resistant *S. aureus* in human and bovine mastitis. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **16**(4), pp. 373-382.

- HOLZAPFEL, W.H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U. and HUIS IN'T VELD, J.H., 1998. Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, **41**(2), pp. 85-101.
- HOOPER, L.V., MIDTVEDT, T. and GORDON, J.I., 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, **22**, pp. 283-307.
- HORNEF, M., 2015. Pathogens, Commensal Symbionts, and Pathobionts: Discovery and Functional Effects on the Host. *ILAR journal*, **56**(2), pp. 159-162.
- HORZ, H.P., 2015. Archaeal Lineages within the Human Microbiome: Absent, Rare or Elusive? *Life (Basel, Switzerland)*, **5**(2), pp. 1333-1345.
- HOUGHTELING, P.D. and WALKER, W.A., 2015a. From Birth to "Immunohealth," Allergies and Enterocolitis. *Journal of clinical gastroenterology*, **49 Suppl 1**, pp. S7-S12.
- HOUGHTELING, P.D. and WALKER, W.A., 2015b. Why is initial bacterial colonization of the intestine important to the infant's and children's health? *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **60**(3), pp. 294-307.
- HOVE, H., 1998. Lactate and short chain fatty acid production in the human colon: implications for D-lactic acidosis, short-bowel syndrome, antibiotic-associated diarrhoea, colonic cancer, and inflammatory bowel disease. *Danish medical bulletin*, **45**(1), pp. 15-33.
- HOWARTH, G.S. and WANG, H., 2013. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients*, **5**(1), pp. 58-81.
- HU, D.L., OMOE, K., INOUE, F., KASAI, T., YASUJIMA, M., SHINAGAWA, K. and NAKANE, A., 2008. Comparative prevalence of superantigenic toxin genes in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of medical microbiology*, **57**(Pt 9), pp. 1106-1112.
- HU, J., NOMURA, Y., BASHIR, A., FERNANDEZ-HERNANDEZ, H., ITZKOWITZ, S., PEI, Z., STONE, J., LOUDON, H. and PETER, I., 2013. Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PloS one*, **8**(11), pp. e78257.
- HUFFNAGLE, G.B. and NOVERR, M.C., 2013. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends in microbiology*, **21**(7), pp. 334-341.
- HUNT, K.M., FOSTER, J.A., FORNEY, L.J., SCHUTTE, U.M., BECK, D.L., ABDO, Z., FOX, L.K., WILLIAMS, J.E., McGUIRE, M.K. and McGUIRE, M.A., 2011. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS one*, **6**(6), pp. e21313.
- HUNT, K.M., PREUSS, J., NISSAN, C., DAVLIN, C.A., WILLIAMS, J.E., SHAFII, B., RICHARDSON, A.D., McGUIRE, M.K., BODE, L. and McGUIRE, M.A., 2012. Human milk oligosaccharides promote the growth of *staphylococci*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**(14), pp. 4763-4770.
- HUNT, K.M., WILLIAMS, J.E., SHAFII, B., HUNT, M.K., BEHRE, R., TING, R., McGUIRE, M.K. and McGUIRE, M.A., 2013. Mastitis is associated with increased free fatty acids, somatic cell count, and interleukin-8 concentrations in human milk. *Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, **8**(1), pp. 105-110.
- HURLEY, W.L. and THEIL, P.K., 2011. Perspectives on immunoglobulins in colostrum and milk. *Nutrients*, **3**(4), pp. 442-474.
- HUYS, G., BOTTELDOORN, N., DELVIGNE, F., DE VUYST, L., HEYNDRIKX, M., POT, B., DUBOIS, J.J. and DAUBE, G., 2013. Microbial characterization of probiotics--advisory report of the Working Group "8651 Probiotics" of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Molecular nutrition & food research*, **57**(8), pp. 1479-1504.
- HUYS, G., VANCANNEYT, M., D'HAENE, K., VANKERCKHOVEN, V., GOOSSENS, H. and SWINGS, J., 2006. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Research in microbiology*, **157**(9), pp. 803-810.
- INNIS, S.M., 2014. Impact of maternal diet on human milk composition and neurological development of infants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **99**(3), pp. 734S-41S.
- IRUSEN, H., ROHWER, A.C., STEYN, D.W. and YOUNG, T., 2015. Treatments for breast abscesses in breastfeeding women. *The*

- Cochrane database of systematic reviews*, (8):CD010490. doi(8), pp. CD010490.
- ISAPP, 2003. Annual Report. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, 2003.
- ISOLAURI, E., ARVOLA, T., SUTAS, Y., MOILANEN, E. and SALMINEN, S., 2000. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **30**(11), pp. 1604-1610.
- JACOBSEN, A.S. and JENSSEN, H., 2012. Human cathelicidin LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Future medicinal chemistry*, **4**(12), pp. 1587-1599.
- JEURINK, P.V., VAN BERGENHENEGOUWEN, J., JIMÉNEZ, E., KNIPPELS, L.M., FERNÁNDEZ, L., GARSSSEN, J., KNOL, J., RODRÍGUEZ, J.M. and MARTÍN, R., 2013. Human milk: a source of more life than we imagine. *Beneficial microbes*, **4**(1), pp. 17-30.
- JIMÉNEZ, E., DELGADO, S., ARROYO, R., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2009. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado (II). *Acta Pediatr Esp*, **67**(3), pp. 125-132.
- JIMÉNEZ, E., ARROYO, R., CÁRDENAS, N., MARÍN, M., SERRANO, P., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2017. Mammary candidiasis: A medical condition without scientific evidence? *PloS one*, **12**(7), pp. e0181071.
- JIMÉNEZ, E., DE ANDRÉS, J., MANRIQUE, M., PAREJA-TOBES, P., TOBES, R., MARTÍNEZ-BLANCH, J.F., CODONER, F.M., RAMÓN, D., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2015. Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **31**(3), pp. 406-415.
- JIMÉNEZ, E., DELGADO, S., MALDONADO, A., ARROYO, R., ALBUJAR, M., GARCÍA, N., JARIOD, M., FERNÁNDEZ, L., GÓMEZ, A. and RODRÍGUEZ, J.M., 2008. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC microbiology*, **8**, pp. 143-2180-8-143.
- JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L., MALDONADO, A., MARTÍN, R., OLIVARES, M., XAUS, J. and RODRÍGUEZ, J.M., 2008. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(15), pp. 4650-4655.
- JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L., MARÍN, M.L., MARTÍN, R., ODRIÓZOLA, J.M., NUENOPALOP, C., NARBAD, A., OLIVARES, M., XAUS, J. and RODRÍGUEZ, J.M., 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current microbiology*, **51**(4), pp. 270-274.
- JIMÉNEZ, E., MARÍN, M.L., MARTÍN, R., ODRIÓZOLA, J.M., OLIVARES, M., XAUS, J., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in microbiology*, **159**(3), pp. 187-193.
- JIMÉNEZ, E., MARTÍN, R., MALDONADO, A., MARTÍN, V., GÓMEZ DE SEGURA, A., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2010. Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *Journal of Bacteriology*, **192**(19), pp. 5266-5267.
- JIMÉNEZ, E., VILLAR-TAJADURA, M.A., MARÍN, M., FONTECHA, J., REQUENA, T., ARROYO, R., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2012. Complete genome sequence of *Bifidobacterium breve* CECT 7263, a strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology*, **194**(14), pp. 3762-3763.
- JOFFE, T.H. and SIMPSON, N.A., 2009. Cesarean section and risk of asthma. The role of intrapartum antibiotics: a missing piece? *The Journal of pediatrics*, **154**(1), pp. 154.
- JOHNSON, M.C., 2010. Anatomy and physiology of the breast. In: I. JATOI and M. KAUFMANN, eds, *Management of Breast Diseases*. Berlin: Springer- Verlag, pp. 1-36.
- JOHNSON, C.L. and VERSALOVIC, J., 2012. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics*, **129**(5), pp. 950-960.
- JOST, T., LACROIX, C., BRAEGGER, C. and CHASSARD, C., 2013. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent

- approaches. *The British journal of nutrition*, **110**(7), pp. 1253-1262.
- JOST, T., LACROIX, C., BRAEGGER, C.P., ROCHAT, F. and CHASSARD, C., 2014. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environmental microbiology*, **16**(9), pp. 2891-2904.
- JUTTE, J., HOHOFF, A., SAUERLAND, C., WIECHMANN, D. and STAMM, T., 2014. In vivo assessment of number of milk duct orifices in lactating women and association with parameters in the mother and the infant. *BMC pregnancy and childbirth*, **14**, pp. 124-2393-14-124.
- KAGUELIDOU, F., TURNER, M.A., CHOONARA, I. and JACQZ-AIGRAIN, E., 2011. Ciprofloxacin use in neonates: a systematic review of the literature. *The Pediatric infectious disease journal*, **30**(2), pp. e29-37.
- KALLIOMAKI, M., OUWEHAND, A., ARVILOMMI, H., KERO, P. and ISOLAURI, E., 1999. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **104**(6), pp. 1251-1257.
- KALLIOMAKI, M., SALMINEN, S., POUSSA, T., ARVILOMMI, H. and ISOLAURI, E., 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*, **361**(9372), pp. 1869-1871.
- KAPLAN, Y.C. and KOREN, G., 2015. Use of ciprofloxacin during breastfeeding. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, **61**(4), pp. 343-344.
- KARAV, S., LE PARC, A., LEITE NOBREGA DE MOURA BELL, J.M., FRESE, S.A., KIRMIZ, N., BLOCK, D.E., BARILE, D. and MILLS, D.A., 2016. Oligosaccharides Released from Milk Glycoproteins Are Selective Growth Substrates for Infant-Associated Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **82**(12), pp. 3622-3630.
- KAWAI, T. and AKIRA, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*, **11**(5), pp. 373-384.
- KAYIRAN, P.G., CAN, F., KAYIRAN, S.M., ERGONUL, O. and GURAKAN, B., 2014. Transmission of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* to a preterm infant through breast milk. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, **27**(5), pp. 527-529.
- KEEFE, G.P., 1997. Streptococcus agalactiae mastitis: a review. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, **38**(7), pp. 429-437.
- KENNY, J.F., 1977. Recurrent group B streptococcal disease in an infant associated with the ingestion of infected mother's milk. *The Journal of pediatrics*, **91**(1), pp. 158-159.
- KHACHATRYAN, Z.A., KTSOYAN, Z.A., MANUKYAN, G.P., KELLY, D., GHAZARYAN, K.A. and AMINOV, R.I., 2008. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS one*, **3**(8), pp. e3064.
- KHANAL, V., SCOTT, J.A., LEE, A.H. and BINNS, C.W., 2015. Incidence of Mastitis in the Neonatal Period in a Traditional Breastfeeding Society: Results of a Cohort Study. *Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, **10**(10), pp. 481-487.
- KHARDORI, N., YASSIEN, M. and WILSON, K., 1995. Tolerance of *Staphylococcus epidermidis* grown from indwelling vascular catheters to antimicrobial agents. *Journal of industrial microbiology*, **15**(3), pp. 148-151.
- KHODAYAR-PARDO, P., MIRA-PASCUAL, L., COLLADO, M.C. and MARTÍNEZ-COSTA, C., 2014. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*, **34**(8), pp. 599-605.
- KLARE, I., KONSTABEL, C., MULLER-BERTLING, S., REISSBRODT, R., HUYS, G., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., GOOSSENS, H. and WITTE, W., 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(12), pp. 8982-8986.
- KLARE, I., KONSTABEL, C., WERNER, G., HUYS, G., VANKERCKHOVEN, V., KAHLMEYER, G., HILDEBRANDT, B., MULLER-BERTLING, S., WITTE, W. and



- GOOSSENS, H., 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **59**(5), pp. 900-912.
- KLEINSCHMIDT, S., HUYGENS, F., FAOAGALI, J., RATHNAYAKE, I.U. and HAFNER, L.M., 2015. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future microbiology*, **10**(11), pp. 1859-1879.
- KLEMENAK, M., DOLINSEK, J., LANGERHOLC, T., DI GIOIA, D. and MICETIC-TURK, D., 2015. Administration of *Bifidobacterium breve* Decreases the Production of TNF-alpha in Children with Celiac Disease. *Digestive diseases and sciences*, **60**(11), pp. 3386-3392.
- KOENIG, J.E., SPOR, A., SCALFONE, N., FRICKER, A.D., STOMBAUGH, J., KNIGHT, R., ANGENENT, L.T. and LEY, R.E., 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108** Suppl 1, pp. 4578-4585.
- KONKEL, J.E. and CHEN, W., 2011. Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal immune system. *Trends in molecular medicine*, **17**(11), pp. 668-676.
- KOYAMA, S., WU, H.J., EASWARAN, T., THOPADY, S. and FOLEY, J., 2013. The nipple: a simple intersection of mammary gland and integument, but focal point of organ function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **18**(2), pp. 121-131.
- KRUIS, W., FRIC, P., POKROTNIEKS, J., LUKAS, M., FIXA, B., KASCAK, M., KAMM, M.A., WEISMUELLER, J., BEGLINGER, C., STOLTE, M., WOLFF, C. and SCHULZE, J., 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut*, **53**(11), pp. 1617-1623.
- KULAGINA, E.V., SHKOPOROV, A.N., KAFARSKAIA, L.I., KHOKHLOVA, E.V., VOLODIN, N.N., DONSKIKH, E.E., KORSHUNOVA, O.V. and EFIMOV, B.A., 2010. Molecular genetic study of species and strain variability in bifidobacteria population in intestinal microflora of breastfed infants and their mothers. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, (150), pp. 61-64.
- KUMAR, H., DU TOIT, E., KULKARNI, A., AAKKO, J., LINDERBORG, K.M., ZHANG, Y., NICOL, M.P., ISOLAURI, E., YANG, B., COLLADO, M.C. and SALMINEN, S., 2016. Distinct Patterns in Human Milk Microbiota and Fatty Acid Profiles Across Specific Geographic Locations. *Frontiers in microbiology*, **7**, pp. 1619.
- KUNZ, C., MEYER, C., COLLADO, M.C., GEIGER, L., GARCÍA-MANTRANA, I., BERTUA-RIOS, B., MARTÍNEZ-COSTA, C., BORSCH, C. and RUDLOFF, S., 2017. Influence of Gestational Age, Secretor, and Lewis Blood Group Status on the Oligosaccharide Content of Human Milk. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **64**(5), pp. 789-798.
- KVERKA, M., BURIANOVA, J., LODINOVA-ZADNIKOVA, R., KOCOURKOVA, I., CINOVA, J., TUCKOVA, L. and TLASKALOVA-HOGENOVA, H., 2007. Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clinical chemistry*, **53**(5), pp. 955-962.
- LAGIER, J.C., MILLION, M., HUGON, P., ARMOUGOM, F. and RAOULT, D., 2012. Human gut microbiota: repertoire and variations. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **2**, pp. 136.
- LAHTINEN, S.J., BOYLE, R.J., KIVIVUORI, S., OPPEDISANO, F., SMITH, K.R., ROBINS-BROWNE, R., SALMINEN, S.J. and TANG, M.L., 2009. Prenatal probiotic administration can influence *Bifidobacterium* microbiota development in infants at high risk of allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **123**(2), pp. 499-501.
- LAI, Y., COGEN, A.L., RADEK, K.A., PARK, H.J., MACLEOD, D.T., LEICHTLE, A., RYAN, A.F., DI NARDO, A. and GALLO, R.L., 2010. Activation of TLR2 by a small molecule produced by *Staphylococcus epidermidis* increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *The Journal of investigative dermatology*, **130**(9), pp. 2211-2221.
- LAI, Y., DI NARDO, A., NAKATSUJI, T., LEICHTLE, A., YANG, Y., COGEN, A.L., WU, Z.R., HOOPER, L.V., SCHMIDT, R.R., VON AULOCK, S., RADEK, K.A., HUANG, C.M., RYAN, A.F. and GALLO, R.L., 2009. Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nature medicine*, **15**(12), pp. 1377-1382.
- LANE, J.A., MEHRA, R.K., CARRINGTON, S.D. and HICKEY, R.M., 2011. Development of

- biosensor-based assays to identify anti-infective oligosaccharides. *Analytical Biochemistry*, **410**(2), pp. 200-205.
- LANGA, S., MALDONADO-BARRAGÁN, A., DELGADO, S., MARTÍN, R., MARTÍN, V., JIMÉNEZ, E., RUIZ-BARBA, J.L., MAYO, B., CONNOR, R.I., SUÁREZ, J.E. and RODRÍGUEZ, J.M., 2012. Characterization of *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **94**(5), pp. 1279-1287.
- LARA-VILLOSLADA, F., SIERRA, S., MARTÍN, R., DELGADO, S., RODRÍGUEZ, J.M., OLIVARES, M. and XAUS, J., 2007. Safety assessment of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714. *Journal of applied microbiology*, **103**(1), pp. 175-184.
- LARSEN, H.D., AARESTRUP, F.M. and JENSEN, N.E., 2002. Geographical variation in the presence of genes encoding superantigenic exotoxins and beta-hemolysin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and USA. *Veterinary microbiology*, **85**(1), pp. 61-67.
- LAUDER, A.P., ROCHE, A.M., SHERRILL-MIX, S., BAILEY, A., LAUGHLIN, A.L., BITTINGER, K., LEITE, R., ELOVITZ, M.A., PARRY, S. and BUSHMAN, F.D., 2016. Comparison of placenta samples with contamination controls does not provide evidence for a distinct placenta microbiota. *Microbiome*, **4**(1), pp. 29-016-0172-3.
- LAURENCE, M., HATZIS, C. and BRASH, D.E., 2014. Common contaminants in next-generation sequencing that hinder discovery of low-abundance microbes. *PloS one*, **9**(5), pp. e97876.
- LAURSEN, M.F., BAHL, M.I., MICHAELSEN, K.F. and LICHT, T.R., 2017. First Foods and Gut Microbes. *Frontiers in microbiology*, **8**, pp. 356.
- LAWRENCE, R.A. and LAWRENCE, R.M., 2011. *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*. 8 edn. St. Louis: Edition. Elsevier/Mosby.
- LEE LE, Y., BHARANI, R., BISWAS, A., LEE, J., TRAN, L.A., PECQUET, S. and STEENHOUT, P., 2015. Normal growth of infants receiving an infant formula containing *Lactobacillus reuteri*, galacto-oligosaccharides, and fructo-oligosaccharide: a randomized controlled trial. *Maternal health, neonatology and perinatology*, **1**, pp. 9-015-0008-3. eCollection 2015.
- LEE, S.M., DONALDSON, G.P., MIKULSKI, Z., BOYAJIAN, S., LEY, K. and MAZMANIAN, S.K., 2013. Bacterial colonization factors control specificity and stability of the gut microbiota. *Nature*, **501**(7467), pp. 426-429.
- LEE, T.T., MORISSET, M., ASTIER, C., MONERET-VAUTRIN, D.A., CORDEBAR, V., BEAUDOUIN, E., CODREANU, F., BIHAIN, B.E. and KANNY, G., 2007. Contamination of probiotic preparations with milk allergens can cause anaphylaxis in children with cow's milk allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **119**(3), pp. 746-747.
- LEFEVRE, C.M., SHARP, J.A. and NICHOLAS, K.R., 2010. Evolution of lactation: ancient origin and extreme adaptations of the lactation system. *Annual review of genomics and human genetics*, **11**, pp. 219-238.
- LENNOX-KING, S.M., O'FARRELL, S.M., BETTELHEIM, K.A. and SHOOTER, R.A., 1976a. Colonization of caesarean section babies by *Escherichia coli*. *Infection*, **4**(3), pp. 134-138.
- LENNOX-KING, S.M., O'FARRELL, S.M., BETTELHEIM, K.A. and SHOOTER, R.A., 1976b. *Escherichia coli* isolated from babies delivered by caesarean section and their environment. *Infection*, **4**(3), pp. 139-145.
- LEWIS, Z.T., TOTTEN, S.M., SMILOWITZ, J.T., POPOVIC, M., PARKER, E., LEMAY, D.G., VAN TASSELL, M.L., MILLER, M.J., JIN, Y.S., GERMAN, J.B., LEBRILLA, C.B. and MILLS, D.A., 2015. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome*, **3**, pp. 13-015-0071-z. eCollection 2015.
- LEY, R.E., PETERSON, D.A. and GORDON, J.I., 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, **124**(4), pp. 837-848.
- LI, J., ZHAO, F., WANG, Y., CHEN, J., TAO, J., TIAN, G., WU, S., LIU, W., CUI, Q., GENG, B., ZHANG, W., WELDON, R., AUGUSTE, K., YANG, L., LIU, X., CHEN, L., YANG, X., ZHU, B. and CAI, J., 2017. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension. *Microbiome*, **5**(1), pp. 14-016-0222-x.

- LI, R., FEIN, S.B., CHEN, J. and GRUMMER-STRAWN, L.M., 2008. Why mothers stop breastfeeding: mothers' self-reported reasons for stopping during the first year. *Pediatrics*, **122 Suppl 2**, pp. S69-76.
- LI, S.W., WATANABE, K., HSU, C.C., CHAO, S.H., YANG, Z.H., LIN, Y.J., CHEN, C.C., CAO, Y.M., HUANG, H.C., CHANG, C.H. and TSAI, Y.C., 2017. Bacterial Composition and Diversity in Breast Milk Samples from Mothers Living in Taiwan and Mainland China. *Frontiers in microbiology*, **8**, pp. 965.
- LI, X., FU, G.F., FAN, Y.R., LIU, W.H., LIU, X.J., WANG, J.J. and XU, G.X., 2003. Bifidobacterium adolescentis as a delivery system of endostatin for cancer gene therapy: selective inhibitor of angiogenesis and hypoxic tumor growth. *Cancer gene therapy*, **10**(2), pp. 105-111.
- LICHTMAN, S.M., 2001. Bacterial translocation in humans. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **33**(1), pp. 1-10.
- LINDMARK-MANSSON, H. and AKESSON, B., 2000. Antioxidative factors in milk. *The British journal of nutrition*, **84 Suppl 1**, pp. S103-10.
- LIONG, M.T., 2008. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutrition reviews*, **66**(4), pp. 192-202.
- LIU, H., ZHAO, Y., ZHAO, D., GONG, T., WU, Y., HAN, H., XU, T., PESCHEL, A., HAN, S. and QU, D., 2015. Antibacterial and anti-biofilm activities of thiazolidine derivatives against clinical *Staphylococcus* strains. *Emerging microbes & infections*, **4**(1), pp. e1.
- LIU, S., 2016. The Development of Our Organ of Other Kinds-The Gut Microbiota. *Frontiers in microbiology*, **7**, pp. 2107.
- LLOYD-PRICE, J., MAHURKAR, A., RAHNAVARD, G., CRABTREE, J., ORVIS, J., HALL, A.B., BRADY, A., CREASY, H.H., MCCracken, C., GIGLIO, M.G., MCDONALD, D., FRANZOSA, E.A., KNIGHT, R., WHITE, O. and HUTTENHOWER, C., 2017. Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*, **550**(7674), pp. 61-66.
- LONNERDAL, B., ERDMANN, P., THAKKAR, S.K., SAUSER, J. and DESTAILLATS, F., 2016. Longitudinal evolution of true protein, amino acids and bioactive proteins in breast milk: a developmental perspective. *The Journal of nutritional biochemistry*, **41**, pp. 1-11.
- LUBETZKY, R., ARGOV-ARGAMAN, N., MIMOUNI, F.B., ARMONI DOMANY, K., SHIFF, Y., BERKOVITZ, Z., REIFEN, R. and MANDEL, D., 2016. Fatty acids composition of human milk fed to small for gestational age infants. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, **29**(18), pp. 3041-3044.
- LUSYATI, S., HULZEBOS, C.V., ZANDVOORT, J., SUKANDAR, H. and SAUER, P.J., 2013. Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. *Journal of neonatal-perinatal medicine*, **6**(2), pp. 153-163.
- LUTHJE, P. and SCHWARZ, S., 2006. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **57**(5), pp. 966-969.
- MA, X.X., ITO, T., TIENSASITORN, C., JAMKLANG, M., CHONGTRAKOOL, P., BOYLE-VAVRA, S., DAUM, R.S. and HIRAMATSU, K., 2002. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**(4), pp. 1147-1152.
- MACFIE, J., 2004. Current status of bacterial translocation as a cause of surgical sepsis. *British medical bulletin*, **71**, pp. 1-11.
- MACIAS, H. and HINCK, L., 2012. Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, **1**(4), pp. 533-557.
- MACKAY, A.D., TAYLOR, M.B., KIBBLER, C.C. and HAMILTON-MILLER, J.M., 1999. *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, **5**(5), pp. 290-292.
- MACKIE, R.I., SGHIR, A. and GASKINS, H.R., 1999. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The*

- American Journal of Clinical Nutrition*, **69**(5), pp. 1035S-1045S.
- MACPHERSON, A.J. and UHR, T., 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, **303**(5664), pp. 1662-1665.
- MADAN, J.C., SALARI, R.C., SAXENA, D., DAVIDSON, L., O'TOOLE, G.A., MOORE, J.H., SOGIN, M.L., FOSTER, J.A., EDWARDS, W.H., PALUMBO, P. and HIBBERD, P.L., 2012. Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, **97**(6), pp. F456-62.
- MADHUSOODANAN, J., SEO, K.S., REMORTEL, B., PARK, J.Y., HWANG, S.Y., FOX, L.K., PARK, Y.H., DEOBALD, C.F., WANG, D., LIU, S., DAUGHERTY, S.C., GILL, A.L., BOHACH, G.A. and GILL, S.R., 2011. An Enterotoxin-Bearing Pathogenicity Island in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, **193**(8), pp. 1854-1862.
- MAHESHWARI, A., KELLY, D.R., NICOLA, T., AMBALAVANAN, N., JAIN, S.K., MURPHY-ULLRICH, J., ATHAR, M., SHIMAMURA, M., BHANDARI, V., APRAHAMIAN, C., DIMMITT, R.A., SERRA, R. and OHLS, R.K., 2011. TGF-beta2 suppresses macrophage cytokine production and mucosal inflammatory responses in the developing intestine. *Gastroenterology*, **140**(1), pp. 242-253.
- MAI, V., TORRAZZA, R.M., UKHANOVA, M., WANG, X., SUN, Y., LI, N., SHUSTER, J., SHARMA, R., HUDAK, M.L. and NEU, J., 2013. Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PloS one*, **8**(1), pp. e52876.
- MAI, V., YOUNG, C.M., UKHANOVA, M., WANG, X., SUN, Y., CASELLA, G., THERIAQUE, D., LI, N., SHARMA, R., HUDAK, M. and NEU, J., 2011. Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PloS one*, **6**(6), pp. e20647.
- MAKINO, H., KUSHIRO, A., ISHIKAWA, E., MUYLAERT, D., KUBOTA, H., SAKAI, T., OISHI, K., MARTIN, R., BEN AMOR, K., OOZEER, R., KNOL, J. and TANAKA, R., 2011. Transmission of intestinal *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(19), pp. 6788-6793.
- MALDONADO, J., LARA-VILLOSLADA, F., SIERRA, S., SEMPERE, L., GÓMEZ, M., RODRÍGUEZ, J.M., BOZA, J., XAUS, J. and OLIVARES, M., 2010. Safety and tolerance of the human milk probiotic strain *Lactobacillus salivarius* CECT5713 in 6-month-old children. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **26**(11-12), pp. 1082-1087.
- MALDONADO-LOBÓN, J.A., DÍAZ-LÓPEZ, M.A., CARPUTO, R., DUARTE, P., DÍAZ-ROPERO, M.P., VALERO, A.D., SANUDO, A., SEMPERE, L., RUIZ-LÓPEZ, M.D., BANUELOS, O., FONOLLA, J. and OLIVARES MARTÍN, M., 2015. *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 Reduces *Staphylococcus* Load in the Breastmilk of Lactating Mothers Suffering Breast Pain: A Randomized Controlled Trial. *Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, **10**(9), pp. 425-432.
- MARIAT, D., FIRMESSE, O., LEVENEZ, F., GUIMARAES, V., SOKOL, H., DORE, J., CORTHIER, G. and FURET, J.P., 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, **9**, pp. 123-2180-9-123.
- MARÍN, M., ARROYO, R., ESPINOSA-MARTOS, I., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2017. Identification of Emerging Human Mastitis Pathogens by MALDI-TOF and Assessment of Their Antibiotic Resistance Patterns. *Frontiers in microbiology*, **8**, pp. 1258.
- MARÍN, M.L., ARROYO, R., JIMÉNEZ, E., GÓMEZ, A., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2009. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **49**(3), pp. 343-348.
- MARSH, L.R., CLEMENTI, E.A. and HAKANSSON, A.P., 2013. Sensitization of *Staphylococcus aureus* to methicillin and other antibiotics in vitro and in vivo in the presence of HAMLET. *PloS one*, **8**(5), pp. e63158.
- MARTEAU, P., MINEKUS, M., HAVENAAR, R. and HUIS IN'T VELD, J.H., 1997. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of dairy science*, **80**(6), pp. 1031-1037.

- MARTEAU, P.R., 2002. Probiotics in clinical conditions. *Clinical reviews in allergy & immunology*, **22**(3), pp. 255-273.
- MARTÍN, R., JIMÉNEZ, E., HEILIG, H., FERNÁNDEZ, L., MARÍN, M.L., ZOETENDAL, E.G. and RODRÍGUEZ, J.M., 2009. Isolation of Bifidobacteria from Breast Milk and Assessment of the Bifidobacterial Population by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Quantitative Real-Time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**(4), pp. 965-969.
- MARTÍN, C.R., LING, P.R. and BLACKBURN, G.L., 2016. Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*, **8**(5), pp. 10.3390/nu8050279.
- MARTÍN, R., HEILIG, G.H., ZOETENDAL, E.G., SMIDT, H. and RODRÍGUEZ, J.M., 2007a. Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of applied microbiology*, **103**(6), pp. 2638-2644.
- MARTÍN, R., HEILIG, H.G., ZOETENDAL, E.G., JIMÉNEZ, E., FERNÁNDEZ, L., SMIDT, H. and RODRÍGUEZ, J.M., 2007b. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in microbiology*, **158**(1), pp. 31-37.
- MARTÍN, R., JIMÉNEZ, E., OLIVARES, M., MARÍN, M.L., FERNÁNDEZ, L., XAUS, J. and RODRÍGUEZ, J.M., 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International journal of food microbiology*, **112**(1), pp. 35-43.
- MARTÍN, R., LANGA, S., REVIRIEGO, C., JIMÉNEZ, E., MARÍN, M.L., XAUS, J., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics*, **143**(6), pp. 754-758.
- MARTÍN, R., OLIVARES, M., MARÍN, M.L., FERNÁNDEZ, L., XAUS, J. and RODRÍGUEZ, J.M., 2005. Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **21**(1), pp. 8-17; quiz 18-21, 41.
- MARTÍN, V., MALDONADO, A., FERNÁNDEZ, L., RODRÍGUEZ, J.M. and CONNOR, R.I., 2010. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by lactic acid bacteria from human breastmilk. *Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, **5**(4), pp. 153-158.
- MARTÍN, V., MALDONADO-BARRAGAN, A., JIMÉNEZ, E., RUAS-MADIEDO, P., FERNÁNDEZ, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2012a. Complete genome sequence of *Streptococcus salivarius* PS4, a strain isolated from human milk. *Journal of Bacteriology*, **194**(16), pp. 4466-4467.
- MARTÍN, V., MALDONADO-BARRAGÁN, A., MOLES, L., RODRÍGUEZ-BAÑOS, M., CAMPO, R.D., FERNÁNDEZ, L., RODRÍGUEZ, J.M. and JIMÉNEZ, E., 2012b. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **28**(1), pp. 36-44.
- MARTÍN, V., MANES-LÁZARO, R., RODRÍGUEZ, J.M. and MALDONADO-BARRAGÁN, A., 2011. *Streptococcus lactarius* sp. nov., isolated from breast milk of healthy women. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**(Pt 5), pp. 1048-1052.
- MARTÍN, V., MEDIANO, P., DEL CAMPO, R., RODRÍGUEZ, J.M. and MARIN, M., 2016. Streptococcal Diversity of Human Milk and Comparison of Different Methods for the Taxonomic Identification of *Streptococci*. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **32**(4), pp. NP84-NP94.
- MARTINO, D.J., CURRIE, H., TAYLOR, A., CONWAY, P. and PRESCOTT, S.L., 2008. Relationship between early intestinal colonization, mucosal immunoglobulin A production and systemic immune development. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **38**(1), pp. 69-78.
- MATAMOROS, S., GRAS-LEGUEN, C., LE VACON, F., POTEL, G. and DE LA COCHETIERE, M.F., 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in microbiology*, **21**(4), pp. 167-173.
- MATOKA, N., YU, Y., MESTAN, K., PEARSON, C., ORTIZ, K., PORTA, N., THORSEN, P., SKOGSTRAND, K., HOUGAARD, D.M., ZUCKERMAN, B. and WANG, X., 2009. Differential patterns of 27 cord blood

- immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*, **123**(5), pp. 1320-1328.
- MAYER, E.A., 2011. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nature reviews. Neuroscience*, **12**(8), pp. 453-466.
- MAZZILLI, M., PICCININI, R., SCALI, F. and ZECCONI, A., 2015. Pattern characterization of genes involved in non-specific immune response in *Staphylococcus aureus* isolates from intramammary infections. *Research in veterinary science*, **103**, pp. 54-59.
- MAZZOCCHI, A., VENTER, C., MASLIN, K. and AGOSTONI, C., 2017. The Role of Nutritional Aspects in Food Allergy: Prevention and Management. *Nutrients*, **9**(8), pp. 10.3390/nu9080850.
- MCCARTHY, A.J. and LINDSAY, J.A., 2010. Genetic variation in *Staphylococcus aureus* surface and immune evasion genes is lineage associated: implications for vaccine design and host-pathogen interactions. *BMC microbiology*, **10**, pp. 173-2180-10-173.
- McFALL-NGAI, M., HADFIELD, M.G., BOSCH, T.C., CAREY, H.V., DOMAZET-LOSO, T., DOUGLAS, A.E., DUBILIER, N., EBERL, G., FUKAMI, T., GILBERT, S.F., HENTSCHEL, U., KING, N., KJELLEBERG, S., KNOLL, A.H., KREMER, N., MAZMANIAN, S.K., METCALF, J.L., NEALSON, K., PIERCE, N.E., RAWLS, J.F., REID, A., RUBY, E.G., RUMPHO, M., SANDERS, J.G., TAUTZ, D. and WERNEGREEN, J.J., 2013. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(9), pp. 3229-3236.
- MCGUIRE, M.K. and MCGUIRE, M.A., 2017. Got bacteria? The astounding, yet not-so-surprising, microbiome of human milk. *Current opinion in biotechnology*, **44**, pp. 63-68.
- MCGUIRE, M.K. and MCGUIRE, M.A., 2015. Human milk: mother nature's prototypical probiotic food? *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, **6**(1), pp. 112-123.
- MCGUIRE, M.K., MEEHAN, C.L., MCGUIRE, M.A., WILLIAMS, J.E., FOSTER, J., SELLEN, D.W., KAMAU-MBUTHIA, E.W., KAMUNDIA, E.W., MBUGUA, S., MOORE, S.E., PRENTICE, A.M., KVIST, L.J., OTOO, G.E., BROOKER, S.L., PRICE, W.J., SHAFII, B., PLACEK, C., LACKEY, K.A., ROBERTSON, B., MANZANO, S., RUIZ, L., RODRÍGUEZ, J.M., PAREJA, R.G. and BODE, L., 2017. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy women vary geographically. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **105**(5), pp. 1086-1100.
- MCGUIRE, S., 2011. U.S. Dept. of Health and Human Services. The Surgeon General's Call to Action to Support Breastfeeding. U.S. Dept. of Health and Human Services, Office of the Surgeon General. 2011. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, **2**(6), pp. 523-524.
- MEDIANO, P., 2015. *Etiología de las mastitis humanas*, Universidad Complutense de Madrid.
- MEDIANO, P., FERNÁNDEZ, L., JIMÉNEZ, E., ARROYO, R., ESPINOSA-MARTOS, I., RODRÍGUEZ, J.M. and MARÍN, M., 2017. Microbial Diversity in Milk of Women With Mastitis: Potential Role of Coagulase-Negative *Staphylococci*, *Viridans Group Streptococci*, and *Corynebacteria*. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **33**(2), pp. 309-318.
- MELNIK, B.C., JOHN, S.M., CARRERA-BASTOS, P. and SCHMITZ, G., 2016. Milk: a postnatal imprinting system stabilizing FoxP3 expression and regulatory T cell differentiation. *Clinical and translational allergy*, **6**, pp. 18-016-0108-9. eCollection 2016.
- MESSINA, J.A., THADEN, J.T., SHARMA-KUINKEL, B.K. and FOWLER, V.G., 2016. Impact of Bacterial and Human Genetic Variation on *Staphylococcus aureus* Infections. *PLoS Pathogens*, **12**(1), pp. e1005330. doi:10.1371/journal.ppat.1005330.
- MICHIE, C., LOCKIE, F. and LYNN, W., 2003. The challenge of mastitis. *Archives of Disease in Childhood*, **88**(9), pp. 818-821.
- MILANI, C., MANCABELLI, L., LUGLI, G.A., DURANTI, S., TURRONI, F., FERRARIO, C., MANGIFESTA, M., VIAPPANI, A., FERRETTI, P., GORFER, V., TETT, A., SEGATA, N., VAN SINDEREN, D. and VENTURA, M., 2015. Exploring Vertical Transmission of Bifidobacteria from Mother to Child. *Applied and Environmental Microbiology*, **81**(20), pp. 7078-7087.
- MILLER, W.B., Jr, 2016. The Eukaryotic Microbiome: Origins and Implications for



- Fetal and Neonatal Life. *Frontiers in pediatrics*, **4**, pp. 96.
- MIN, Y.W. and RHEE, P.L., 2015. The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clinical therapeutics*, **37**(5), pp. 968-975.
- MINOT, S., BRYSON, A., CHEHOUD, C., WU, G.D., LEWIS, J.D. and BUSHMAN, F.D., 2013. Rapid evolution of the human gut virome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**(30), pp. 12450-12455.
- MIRA, A. and RODRÍGUEZ, J.M., 2017. The origin of human milk bacteria. In: M. MCGUIRE, M. MCGUIRE and L. BODE, eds, *Prebiotics and Probiotics in Human Milk*. London: Academic Press, pp. 349-364.
- MIRAGAIA, M., COUTO, I. and DE LENCASTRE, H., 2005. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, **11**(2), pp. 83-93.
- MOAZZEZ, A., KELSO, R.L., TOWFIGH, S., SOHN, H., BERNE, T.V. and MASON, R.J., 2007. Breast abscess bacteriologic features in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemics. *Archives of surgery (Chicago, Ill.: 1960)*, **142**(9), pp. 881-884.
- MOHAN, R., KOEBNICK, C., SCHILDT, J., SCHMIDT, S., MUELLER, M., POSSNER, M., RADKE, M. and BLAUT, M., 2006. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. *Journal of clinical microbiology*, **44**(11), pp. 4025-4031.
- MOLES, L., ESCRIBANO, E., DE ANDRÉS, J., MONTES, M.T., RODRÍGUEZ, J.M., JIMÉNEZ, E., SÁENZ DE PIPAÓN, M. and ESPINOSA-MARTOS, I., 2015. Administration of *Bifidobacterium breve* PS12929 and *Lactobacillus salivarius* PS12934, two strains isolated from human milk, to very low and extremely low birth weight preterm infants: a pilot study. *Journal of immunology research*, **2015**, pp. 538171.
- MOLES, L., GÓMEZ, M., HEILIG, H., BUSTOS, G., FUENTES, S., DE VOS, W., FERNÁNDEZ, L., RODRÍGUEZ, J.M. and JIMÉNEZ, E., 2013. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS one*, **8**(6), pp. e66986.
- MONECKE, S., KUHNERT, P., HOTZEL, H., SLICKERS, P. and EHRLICH, R., 2007. Microarray based study on virulence-associated genes and resistance determinants of *Staphylococcus aureus* isolates from cattle. *Veterinary microbiology*, **125**(1-2), pp. 128-140.
- MONERET-VAUTRIN, D.A., MORISSET, M., CORDEBAR, V., CODREANU, F. and KANNY, G., 2006. Probiotics may be unsafe in infants allergic to cow's milk. *Allergy*, **61**(4), pp. 507-508.
- MOORE, F.A., MOORE, E.E., POGGETTI, R.S. and READ, R.A., 1992. Post injury shock and early bacteremia. A lethal combination. *Archives of surgery (Chicago, Ill.: 1960)*, **127**(8), pp. 893-7; discussion 897-8.
- MOORE, W.E. and MOORE, L.H., 1995. Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**(9), pp. 3202-3207.
- MORELI, J.B., CORREA-SILVA, S., DAMASCENO, D.C., SINZATO, Y.K., LORENZON-OJEA, A.R., BORBELY, A.U., RUDGE, M.V., BEVILACQUA, E. and CALDERON, I.M., 2015. Changes in the TNF-alpha/IL-10 ratio in hyperglycemia-associated pregnancies. *Diabetes research and clinical practice*, **107**(3), pp. 362-369.
- MSHVILDADZE, M., NEU, J., SHUSTER, J., THERIAQUE, D., LI, N. and MAI, V., 2010. Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *The Journal of pediatrics*, **156**(1), pp. 20-25.
- MUHL, H., KOCHER, A.J., DISQUE, C. and SAKKA, S.G., 2010. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, **66**(1), pp. 41-49.
- MURAKAMI, M., DORSCHNER, R.A., STERN, L.J., LIN, K.H. and GALLO, R.L., 2005. Expression and secretion of cathelicidin antimicrobial peptides in murine mammary glands and human milk. *Pediatric research*, **57**(1), pp. 10-15.
- MURK, W., RISNES, K.R. and BRACKEN, M.B., 2011. Prenatal or early-life exposure to antibiotics and risk of childhood asthma: a systematic review. *Pediatrics*, **127**(6), pp. 1125-1138.

- MURPHY, J., SHERMAN, M.E., BROWNE, E.P., CABALLERO, A.I., PUNSKA, E.C., PFEIFFER, R.M., YANG, H.P., LEE, M., YANG, H., GIERACH, G.L. and ARCARO, K.F., 2016. Potential of breastmilk analysis to inform early events in breast carcinogenesis: rationale and considerations. *Breast cancer research and treatment*, **157**(1), pp. 13-22.
- MUSUMECI, G., CASTROGIOVANNI, P., SZYCHLINSKA, M.A., AIELLO, F.C., VECCHIO, G.M., SALVATORELLI, L., MAGRO, G. and IMBESI, R., 2015. Mammary gland: From embryogenesis to adult life. *Acta Histochemica*, **117**(4-5), pp. 379-385.
- MUTSCHLECHNER, W., KARALL, D., HARTMANN, C., STREITER, B., BAUMGARTNER-SIGL, S., ORTH-HOLLER, D. and LASS-FLORL, C., 2016. Mammary candidiasis: molecular-based detection of *Candida* species in human milk samples. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **35**(8), pp. 1309-1313.
- NAGAKURA, C., HAYASHI, K., ZHAO, M., YAMAUCHI, K., YAMAMOTO, N., TSUCHIYA, H., TOMITA, K., BOUVET, M. and HOFFMAN, R.M., 2009. Efficacy of a genetically-modified *Salmonella typhimurium* in an orthotopic human pancreatic cancer in nude mice. *Anticancer Research*, **29**(6), pp. 1873-1878.
- NAIK, S., BOULADOUX, N., WILHELM, C., MOLLOY, M.J., SALCEDO, R., KASTENMULLER, W., DEMING, C., QUINONES, M., KOO, L., CONLAN, S., SPENCER, S., HALL, J.A., DZUTSEV, A., KONG, H., CAMPBELL, D.J., TRINCHIERI, G., SEGRE, J.A. and BELKAID, Y., 2012. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science (New York, N.Y.)*, **337**(6098), pp. 1115-1119.
- NEVILLE, M.C. and MORTON, J., 2001. Physiology and endocrine changes underlying human lactogenesis II. *The Journal of nutrition*, **131**(11), pp. 3005S-8S.
- NEWBURG, D.S., 2005. Innate immunity and human milk. *The Journal of nutrition*, **135**(5), pp. 1308-1312.
- NGUYEN, D.N., SANGILD, P.T., OSTERGAARD, M.V., BERING, S.B. and CHATTERTON, D.E., 2014. Transforming growth factor-beta2 and endotoxin interact to regulate homeostasis via interleukin-8 levels in the immature intestine. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **307**(7), pp. G689-99.
- NIKNIAZ, L., OSTADRAHIMI, A., MAHDAVI, R., HEJAZI, M.A. and SALEKDEH, G.H., 2013. Effects of symbiotic supplementation on breast milk levels of IgA, TGF-beta1, and TGF-beta2. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **29**(4), pp. 591-596.
- NISHIMURA, R.Y., BARBIEIRI, P., CASTRO, G.S., JORDAO, A.A., Jr., PERDONA GDA, S. and SARTORELLI, D.S., 2014. Dietary polyunsaturated fatty acid intake during late pregnancy affects fatty acid composition of mature breast milk. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, **30**(6), pp. 685-689.
- NOOH, M.M., EL-GENGEHI, N., KANSAL, R., DAVID, C.S. and KOTB, M., 2007. HLA transgenic mice provide evidence for a direct and dominant role of HLA class II variation in modulating the severity of streptococcal sepsis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **178**(5), pp. 3076-3083.
- NURIEL-OHAYON, M., NEUMAN, H. and KOREN, O., 2016. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Frontiers in microbiology*, **7**, pp. 1031.
- ODDY, W.H., HALONEN, M., MARTINEZ, F.D., LOHMAN, I.C., STERN, D.A., KURZIUS-SPENCER, M., GUERRA, S. and WRIGHT, A.L., 2003. TGF-beta in human milk is associated with wheeze in infancy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **112**(4), pp. 723-728.
- ODDY, W.H. and ROSALES, F., 2010. A systematic review of the importance of milk TGF-beta on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatric allergy and immunology: official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, **21**(1 Pt 1), pp. 47-59.
- OFTEDAL, O.T., 2002. The mammary gland and its origin during synapsid evolution. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **7**(3), pp. 225-252.
- OFTEDAL, O.T. and DHOUAILLY, D., 2013. Evo-devo of the mammary gland. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **18**(2), pp. 105-120.
- OGGIONI, M.R., POZZI, G., VALENSIN, P.E., GALIENI, P. and BIGAZZI, C., 1998. Recurrent septicemia in an

- immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of clinical microbiology*, **36**(1), pp. 325-326.
- O'HARA, A.M. and SHANAHAN, F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, **7**(7), pp. 688-693.
- OLIVARES, M., DÍAZ-ROPERO, M.P., GÓMEZ, N., LARA-VILLOSLADA, F., SIERRA, S., MALDONADO, J.A., MARTÍN, R., RODRÍGUEZ, J.M. and XAUS, J., 2006. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasser* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, **9**(1), pp. 47-52.
- OLIVER, S.P., MURINDA, S.E. and JAYARAO, B.M., 2011. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. *Foodborne pathogens and disease*, **8**(3), pp. 337-355.
- OOZEER, R., VAN LIMPT, K., LUDWIG, T., BEN AMOR, K., MARTIN, R., WIND, R.D., BOEHM, G. and KNOL, J., 2013. Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **98**(2), pp. 561S-71S.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H.B. and KOLTER, R., 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, **54**, pp. 49-79.
- OTTOMAN, N., SMIDT, H., DE VOS, W.M. and BELZER, C., 2012. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, **2**, pp. 104.
- OTTO, M., 2012. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in immunopathology*, **34**(2), pp. 201-214.
- OTTO, M., 2009. *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nature reviews.Microbiology*, **7**(8), pp. 555-567.
- OUWEHAND, A.C., KIRJAVAINEN, P.V., SHORTT, C. and SALMINEN, S., 1999. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J*, **9**, pp. 43-52.
- OUWEHAND, A.C., ISOLAURI, E., HE, F., HASHIMOTO, H., BENNO, Y. and SALMINEN, S., 2001. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **108**(1), pp. 144-145.
- PAPAGAROUFALIS, K., FOTIOU, A., EGLI, D., TRAN, L.A. and STEENHOUT, P., 2014. A Randomized Double Blind Controlled Safety Trial Evaluating d-Lactic Acid Production in Healthy Infants Fed a *Lactobacillus reuteri*-containing Formula. *Nutrition and metabolic insights*, **7**, pp. 19-27.
- PARFREY, L.W., WALTERS, W.A., LAUBER, C.L., CLEMENTE, J.C., BERG-LYONS, D., TEILING, C., KODIRA, C., MOHIUDDIN, M., BRUNELLE, J., DRISCOLL, M., FIERER, N., GILBERT, J.A. and KNIGHT, R., 2014. Communities of microbial eukaryotes in the mammalian gut within the context of environmental eukaryotic diversity. *Frontiers in microbiology*, **5**, pp. 298.
- PARK, J.Y., FOX, L.K., SEO, K.S., MCGUIRE, M.A., PARK, Y.H., RURANGIRWA, F.R., SISCHO, W.M. and BOHACH, G.A., 2011. Detection of classical and newly described staphylococcal superantigen genes in coagulase-negative *staphylococci* isolated from bovine intramammary infections. *Veterinary microbiology*, **147**(1-2), pp. 149-154.
- PATEL, S.H., VAIDYA, Y.H., PATEL, R.J., PANDIT, R.J., JOSHI, C.G. and KUNJADIYA, A.P., 2017. Culture independent assessment of human milk microbial community in lactational mastitis. *Scientific reports*, **7**(1), pp. 7804-017-08451-7.
- PAVIOUR, S., MUSAAD, S., ROBERTS, S., TAYLOR, G., TAYLOR, S., SHORE, K., LANG, S. and HOLLAND, D., 2002. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **35**(11), pp. 1434-1440.
- PENDERS, J., THIJS, C., VINK, C., STELMA, F.F., SNIJDERS, B., KUMMELING, I., VAN DEN BRANDT, P.A. and STOBBERINGH, E.E., 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, **118**(2), pp. 511-521.
- PENTTILA, I., 2006. Effects of transforming growth factor-beta and formula feeding on systemic immune responses to dietary beta-

- lactoglobulin in allergy-prone rats. *Pediatric research*, **59**(5), pp. 650-655.
- PENTTILA, I.A., 2010a. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *The Journal of pediatrics*, **156**(2 Suppl), pp. S21-5.
- PENTTILA, I.A., 2010b. Milk-derived transforming growth factor-beta and the infant immune response. *The Journal of pediatrics*, **156**(2 Suppl), pp. S21-5.
- PÉREZ, M., LADERO, V., REDRUELLO, B., DEL RÍO, B., FERNÁNDEZ, L., RODRÍGUEZ, J.M., MARTÍN, M.C., FERNÁNDEZ, M. and ÁLVAREZ, M.A., 2016. Mastitis Modifies the Biogenic Amines Profile in Human Milk, with Significant Changes in the Presence of Histamine, Putrescine and Spermine. *PloS one*, **11**(9), pp. e0162426.
- PERÉZ, P.F., DORÉ, J., LECLERC, M., LEVENEZ, F., BENYACOU, J., SERRANT, P., SEGURA-ROGGERO, I., SCHIFFRIN, E.J. and DONNET-HUGHES, A., 2007. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics*, **119**(3), pp. e724-32.
- PERÉZ-MUÑOZ, M.E., ARRIETA, M.C., RAMER-TAIT, A.E. and WALTER, J., 2017. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*, **5**(1), pp. 48-017-0268-4.
- PETROF, E.O., GLOOR, G.B., VANNER, S.J., WEESE, S.J., CARTER, D., DAIGNEAULT, M.C., BROWN, E.M., SCHROETER, K. and ALLEN-VERCOE, E., 2013. Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut. *Microbiome*, **1**(1), pp. 3-2618-1-3.
- PINEIRO, M., ASP, N.G., REID, G., MACFARLANE, S., MORELLI, L., BRUNSER, O. and TUOHY, K., 2008. FAO Technical meeting on prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology*, **42** Suppl 3 Pt 2, pp. S156-9.
- PIROFSKI, L.A. and CASADEVALL, A., 2012. Q and A: What is a pathogen? A question that begs the point. *BMC biology*, **10**, pp. 6-7007-10-6.
- PRESCOTT, S.L., WICKENS, K., WESTCOTT, L., JUNG, W., CURRIE, H., BLACK, P.N., STANLEY, T.V., MITCHELL, E.A., FITZHARRIS, P., SIEBERS, R., WU, L., CRANE, J. and PROBIOTIC STUDY GROUP, 2008. Supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* or *Bifidobacterium lactis* probiotics in pregnancy increases cord blood interferon-gamma and breast milk transforming growth factor-beta and immunoglobulin A detection. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, **38**(10), pp. 1606-1614.
- QIN, J., LI, R., RAES, J., ARUMUGAM, M., BURGDORF, K.S., MANICHANH, C., NIELSEN, T., PONS, N., LEVENEZ, F., YAMADA, T., MENDE, D.R., LI, J., XU, J., LI, S., LI, D., CAO, J., WANG, B., LIANG, H., ZHENG, H., XIE, Y., TAP, J., LEPAGE, P., BERTALAN, M., BATTO, J.M., HANSEN, T., LE PASLIER, D., LINNEBERG, A., NIELSEN, H.B., PELLETIER, E., RENAULT, P., SICHERITZ-PONTEN, T., TURNER, K., ZHU, H., YU, C., LI, S., JIAN, M., ZHOU, Y., LI, Y., ZHANG, X., LI, S., QIN, N., YANG, H., WANG, J., BRUNAK, S., DORE, J., GUARNER, F., KRISTIANSEN, K., PEDERSEN, O., PARKHILL, J., WEISSENBAACH, J., METAHIT CONSORTIUM, BORK, P., EHRLICH, S.D. and WANG, J., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, **464**(7285), pp. 59-65.
- QUAGLIARIELLO, A., ALOISIO, I., BOZZI CIONCI, N., LUISELLI, D., D'AURIA, G., MARTÍNEZ-PRIEGO, L., PÉREZ-VILLARROYA, D., LANGERHOLC, T., PRIMEC, M., MICETIC-TURK, D. and DI GIOIA, D., 2016. Effect of *Bifidobacterium breve* on the Intestinal Microbiota of Coeliac Children on a Gluten Free Diet: A Pilot Study. *Nutrients*, **8**(10), pp. E660.
- QUINN, E.A., LARGADO, F., POWER, M. and KUZAWA, C.W., 2012. Predictors of breast milk macronutrient composition in Filipino mothers. *American Journal of Human Biology: The Official Journal of the Human Biology Council*, **24**(4), pp. 533-540.
- QUTAISHAT, S.S., STEMPER, M.E., SPENCER, S.K., BORCHARDT, M.A., OPITZ, J.C., MONSON, T.A., ANDERSON, J.L. and ELLINGSON, J.L., 2003. Transmission of *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 to infants through mother's breast milk. *Pediatrics*, **111**(6 Pt 1), pp. 1442-1446.
- RAAD, I., HANNA, H. and MAKI, D., 2007. Intravascular catheter-related infections: advances in diagnosis, prevention, and

- management. *The Lancet. Infectious diseases*, **7**(10), pp. 645-657.
- RAIHA, N.C., FAZZOLARI-NESCI, A., CAJOZZO, C., PUCCIO, G., MONESTIER, A., MORO, G., MINOLI, I., HASCHKE-BECHER, E., BACHMANN, C., VAN'T HOF, M., CARRIE FASSLER, A.L. and HASCHKE, F., 2002. Whey predominant, whey modified infant formula with protein/energy ratio of 1.8 g/100 kcal: adequate and safe for term infants from birth to four months. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **35**(3), pp. 275-281.
- RAJILIC-STOJANOVIC, M. and DE VOS, W.M., 2014. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS microbiology reviews*, **38**(5), pp. 996-1047.
- RAMSAY, D.T., KENT, J.C., HARTMANN, R.A. and HARTMANN, P.E., 2005. Anatomy of the lactating human breast redefined with ultrasound imaging. *Journal of anatomy*, **206**(6), pp. 525-534.
- RANTASALO, I. and KAUPPINEN, M.A., 1959. The occurrence of *Staphylococcus aureus* in mother's milk. *Annales Chirurgiae et Gynaecologiae Fenniae*, **48**, pp. 246-258.
- RAUTAVA, S., KALLIOMAKI, M. and ISOLAURI, E., 2002. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **109**(1), pp. 119-121.
- RAUTAVA, S., LU, L., NANTHAKUMAR, N.N., DUBERT-FERRANDON, A. and WALKER, W.A., 2012. TGF-beta2 induces maturation of immature human intestinal epithelial cells and inhibits inflammatory cytokine responses induced via the NF-kappaB pathway. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **54**(5), pp. 630-638.
- RAUTIO, M., JOUSIMIES-SOMER, H., KAUMA, H., PIETARINEN, I., SAXELIN, M., TYNKKYNEN, S. and KOSKELA, M., 1999. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **28**(5), pp. 1159-1160.
- REDDY, P., QI, C., ZEMBOWER, T., NOSKIN, G.A. and BOLON, M., 2007. Postpartum mastitis and community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases*, **13**(2), pp. 298-301.
- RENFREW, M.J., MCCORMICK, F.M., WADE, A., QUINN, B. and DOWSWELL, T., 2012. Support for healthy breastfeeding mothers with healthy term babies. *The Cochrane database of systematic reviews*, **(5):CD001141**. doi(5), pp. CD001141.
- RENSHAW, A.A., DERHAGOPIAN, R.P. and GOULD, E.W., 2011. Cystic neutrophilic granulomatous mastitis: an underappreciated pattern strongly associated with gram-positive bacilli. *American Journal of Clinical Pathology*, **136**(3), pp. 424-427.
- RENZ, H., 2013. Advances in in vitro diagnostics in allergy, asthma, and immunology in 2012. *The Journal of allergy and clinical immunology*, **132**(6), pp. 1287-1292.
- RENZ, H., BRANDTZAEG, P. and HORNEF, M., 2011. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nature reviews. Immunology*, **12**(1), pp. 9-23.
- RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAEHEBUHL, J.P. and RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology*, **2**(4), pp. 361-367.
- RICH, M., DEIGHTON, L. and ROBERTS, L., 2005. Clindamycin-resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from animals. *Veterinary microbiology*, **111**(3-4), pp. 237-240.
- RICHARD, V., VAN DER AUWERA, P., SNOECK, R., DANEAU, D. and MEUNIER, F., 1988. Nosocomial bacteremia caused by *Bacillus* species. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, **7**(6), pp. 783-785.
- RIGBY, K.M. and DELEO, F.R., 2012. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. *Seminars in immunopathology*, **34**(2), pp. 237-259.
- RINALDI, M., LI, R.W. and CAPUCO, A.V., 2010. Mastitis associated transcriptomic disruptions in cattle. *Veterinary immunology and immunopathology*, **138**(4), pp. 267-279.

- RINGEL-KULKA, T., CHENG, J., RINGEL, Y., SALOJARVI, J., CARROLL, I., PALVA, A., DE VOS, W.M. and SATOKARI, R., 2013. Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults--a high throughput microarray analysis. *PloS one*, **8**(5), pp. e64315.
- RIVAS-SANTIAGO, B., SERRANO, C.J. and ENCISO-MORENO, J.A., 2009. Susceptibility to infectious diseases based on antimicrobial peptide production. *Infection and immunity*, **77**(11), pp. 4690-4695.
- RODRÍGUEZ, J.M. and DALMAU, J., 2007a. Probióticos para el binomio madre-hijo (II). *Acta Pediatr Esp*, **65**(10), pp. 513-518.
- RODRÍGUEZ, J.M. and DALMAU, J., 2007b. Probióticos para el binomio madre-hijo (I). *Acta Pediatr Esp*, **65**(452), pp. 457.
- RODRÍGUEZ, A.V., BAIGORI, M.D., ÁLVAREZ, S., CASTRO, G.R. and OLIVER, G., 2001. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Lactobacillus rhamnosus* with capacity to translocate. *FEMS microbiology letters*, **204**(1), pp. 33-38.
- RODRÍGUEZ, J.M., 2015. Probiotics: from the lab to the consumer. *Nutricion hospitalaria*, **31 Suppl 1**, pp. 33-47.
- RODRÍGUEZ, J.M., 2014. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, **5**(6), pp. 779-784.
- RODRÍGUEZ, N.A., MEIER, P.P., GROER, M.W. and ZELLER, J.M., 2009. Oropharyngeal administration of colostrum to extremely low birth weight infants: theoretical perspectives. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*, **29**(1), pp. 1-7.
- RODRÍGUEZ-CASTANO, G.P., CARO-QUINTERO, A., REYES, A. and LIZCANO, F., 2017. Advances in Gut Microbiome Research, Opening New Strategies to Cope with a Western Lifestyle. *Frontiers in genetics*, **7**, pp. 224.
- ROGERS, K.L., FEY, P.D. and RUPP, M.E., 2009. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infectious disease clinics of North America*, **23**(1), pp. 73-98.
- ROGOSCH, T., KERZEL, S., HOSS, K., HOERSCH, G., ZEMLIN, C., HECKMANN, M., BEREK, C., SCHROEDER, H.W., Jr, MAIER, R.F. and ZEMLIN, M., 2012. IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **189**(11), pp. 5449-5456.
- ROITT, I.M. and DELVES, P.J., 2001. *Essential Immunology*. 10th edn. Oxford: Blackwell Science.
- ROSENSTEIN, R. and GOTZ, F., 2000. Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*, **82**(11), pp. 1005-1014.
- ROUGE, C., GOLDENBERG, O., FERRARIS, L., BERGER, B., ROCHAT, F., LEGRAND, A., GOBEL, U.B., VODOVAR, M., VOYER, M., ROZE, J.C., DARMAUN, D., PILOQUET, H., BUTEL, M.J. and DE LA COCHETIERE, M.F., 2010. Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe*, **16**(4), pp. 362-370.
- ROUND, J.L. and MAZMANIAN, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews.Immunology*, **9**(5), pp. 313-323.
- RUIZ, L., ESPINOSA-MARTOS, I., GARCÍA-CARRAL, C., MANZANO, S., McGUIRE, M.K., MEEHAN, C.L., McGUIRE, M.A., WILLIAMS, J.E., FOSTER, J., SELLEN, D.W., KAMAU-MBUTHIA, E.W., KAMUNDIA, E.W., MBUGUA, S., MOORE, S.E., KVIST, L.J., OTOO, G.E., LACKEY, K.A., FLORES, K., PAREJA, R.G., BODE, L. and RODRÍGUEZ, J.M., 2017. What's Normal? Immune Profiling of Human Milk from Healthy Women Living in Different Geographical and Socioeconomic Settings. *Frontiers in immunology*, **8**, pp. 696.
- RUTAYISIRE, E., HUANG, K., LIU, Y. and TAO, F., 2016. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC gastroenterology*, **16**(1), pp. 86-016-0498-0.
- RUTAYISIRE, E., WU, X., HUANG, K., TAO, S., CHEN, Y. and TAO, F., 2016. Cesarean section may increase the risk of both overweight and obesity in preschool children. *BMC pregnancy and childbirth*, **16**(1), pp. 338.
- SAAVEDRA, J.M., ABI-HANNA, A., MOORE, N. and YOLKEN, R.H., 2004. Long-term consumption of infant formulas containing



- live probiotic bacteria: tolerance and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **79**(2), pp. 261-267.
- SAKATA, H., YOSHIOKA, H. and FUJITA, K., 1985. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *European journal of pediatrics*, **144**(2), pp. 186-190.
- SAKWINSKA, O., MOINE, D., DELLEY, M., COMBREMONT, S., REZZONICO, E., DESCOMBES, P., VINYES-PARES, G., ZHANG, Y., WANG, P. and THAKKAR, S.K., 2016. Microbiota in Breast Milk of Chinese Lactating Mothers. *PloS one*, **11**(8), pp. e0160856.
- SALEM, M., SEIDELIN, J.B., EICKHARDT, S., ALHEDE, M., ROGLER, G. and NIELSEN, O.H., 2015. Species-specific engagement of human nucleotide oligomerization domain 2 (NOD)2 and Toll-like receptor (TLR) signalling upon intracellular bacterial infection: role of Crohn's associated NOD2 gene variants. *Clinical and experimental immunology*, **179**(3), pp. 426-434.
- SALMINEN, M.K., TYNKKYNNEN, S., RAUTELIN, H., SAXELIN, M., VAARA, M., RUUTU, P., SARNA, S., VALTONEN, V. and JARVINEN, A., 2002. Lactobacillus bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **35**(10), pp. 1155-1160.
- SALTER, S.J., COX, M.J., TUREK, E.M., CALUS, S.T., COOKSON, W.O., MOFFATT, M.F., TURNER, P., PARKHILL, J., LOMAN, N.J. and WALKER, A.W., 2014. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC biology*, **12**, pp. 87-014-0087-z.
- SAM MA, Z., GUAN, Q., YE, C., ZHANG, C., FOSTER, J.A. and FORNEY, L.J., 2015. Network analysis suggests a potentially 'evil' alliance of opportunistic pathogens inhibited by a cooperative network in human milk bacterial communities. *Scientific reports*, **5**, pp. 8275.
- SANDERS, M.E., AKKERMANS, L.M.A., HALLER, D., HAMMERMAN, C., HEIMBACH, J., HÄRMANNSPERGER, G., HUYS, G., LEVY, D.D., LUTGENDORFF, F., MACK, D., PHOTHIRATH, P., SOLANO-AGUILAR, G. and VAUGHAN, E., 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, **1**(3), pp. 164-185.
- SANZ, Y., COLLADO, M.C., HAROS, C.M. and DALMAU, J., 2004. Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: Probióticos y prebióticos. **62**.
- SAULNIER, D.M., RINGEL, Y., HEYMAN, M.B., FOSTER, J.A., BERCIK, P., SHULMAN, R.J., VERSALOVIC, J., VERDU, E.F., DINAN, T.G., HECHT, G. and GUARNER, F., 2013. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut microbes*, **4**(1), pp. 17-27.
- SAULNIER, D.M., SANTOS, F., ROOS, S., MISTRETTA, T.A., SPINLER, J.K., MOLENAAR, D., TEUSINK, B. and VERSALOVIC, J., 2011. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PloS one*, **6**(4), pp. e18783.
- SAVINO, F., CORDISCO, L., TARASCO, V., PALUMERI, E., CALABRESE, R., OGGERO, R., ROOS, S. and MATTEUZZI, D., 2010. Lactobacillus reuteri DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics*, **126**(3), pp. e526-33.
- SAXELIN, M., AHOKAS, M. and SALMINEN, S., 1993. Dose Response on the Faecal Colonisation of *Lactobacillus* Strain GG Administered in Two Different Formulations. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **6**(3), pp. 119-122.
- SAXELIN, M., PESSI, T. and SALMINEN, S., 1995. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *International journal of food microbiology*, **25**(2), pp. 199-203.
- SCHANLER, R.J., FRALEY, J.K., LAU, C., HURST, N.M., HORVATH, L. and ROSSMANN, S.N., 2011. Breastmilk cultures and infection in extremely premature infants. *Journal of perinatology: official journal of the California Perinatal Association*, **31**(5), pp. 335-338.
- SCHELE, E., GRAHNEMO, L., ANESTEN, F., HALLEN, A., BACKHED, F. and JANSSON, J.O., 2016. Regulation of body fat mass by the gut microbiota: Possible mediation by the brain. *Peptides*, **77**, pp. 54-59.

- SCHLEIFER, K.H., HARTINGER, A. and GÖTZ, F., 1978. Occurrence of d-tagatose-6-phosphate pathway of d-galactose metabolism among *staphylococci*. *FEMS microbiology letters*, **3**(1), pp. 9-11.
- SCHMIDT, V.M., WILLIAMS, N.J., PINCHBECK, G., CORLESS, C.E., SHAW, S., MCEWAN, N., DAWSON, S. and NUTTALL, T., 2014. Antimicrobial resistance and characterisation of *staphylococci* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *BMC veterinary research*, **10**, pp. 17-6148-10-17.
- SCHOENFELDER, S.M., LANGE, C., ECKART, M., HENNIG, S., KOZYTSKA, S. and ZIEBUHR, W., 2010. Success through diversity - how *Staphylococcus epidermidis* establishes as a nosocomial pathogen. *International journal of medical microbiology: IJMM*, **300**(6), pp. 380-386.
- SCHOLTENS, P.A., ALLIET, P., RAES, M., ALLES, M.S., KROES, H., BOEHM, G., KNIPPELS, L.M., KNOL, J. and VANDENPLAS, Y., 2008. Fecal secretory immunoglobulin A is increased in healthy infants who receive a formula with short-chain galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides. *The Journal of nutrition*, **138**(6), pp. 1141-1147.
- SCHOLTENS, P.A., OOZEER, R., MARTÍN, R., AMOR, K.B. and KNOL, J., 2012. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annual review of food science and technology*, **3**, pp. 425-447.
- SCHUKKEN, Y.H., GUNTHER, J., FITZPATRICK, J., FONTAINE, M.C., GOETZE, L., HOLST, O., LEIGH, J., PETZL, W., SCHUBERTH, H.J., SIPKA, A., SMITH, D.G., QUESNELL, R., WATTS, J., YANCEY, R., ZERBE, H., GURJAR, A., ZADOKS, R.N., SEYFERT, H.M. and MEMBERS OF THE PFIZER MASTITIS RESEARCH CONSORTIUM, 2011. Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary immunology and immunopathology*, **144**(3-4), pp. 270-289.
- SCHWALBE, R.S., STAPLETON, J.T. and GILLIGAN, P.H., 1987. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative *staphylococci*. *The New England journal of medicine*, **316**(15), pp. 927-931.
- SECTION ON BREASTFEEDING, 2012. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, **129**(3), pp. e827-41.
- SEDMAN, P.C., MACFIE, J., SAGAR, P., MITCHELL, C.J., MAY, J., MANCEY-JONES, B. and JOHNSTONE, D., 1994. The prevalence of gut translocation in humans. *Gastroenterology*, **107**(3), pp. 643-649.
- SEIGEL, J.K., SMITH, P.B., ASHLEY, P.L., COTTEN, C.M., HERBERT, C.C., KING, B.A., MAYNOR, A.R., NEILL, S., WYNN, J. and BIDEgain, M., 2013. Early administration of oropharyngeal colostrum to extremely low birth weight infants. *Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, **8**(6), pp. 491-495.
- SENDER, R., FUCHS, S. and MILO, R., 2016. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, **14**(8), pp. e1002533.
- SERAFINI, F., STRATI, F., RUAS-MADIEDO, P., TURRONI, F., FORONI, E., DURANTI, S., MILANO, F., PEROTTI, A., VIAPPANI, A., GUGLIELMETTI, S., BUSCHINI, A., MARGOLLES, A., VAN SINDEREN, D. and VENTURA, M., 2013. Evaluation of adhesion properties and antibacterial activities of the infant gut commensal *Bifidobacterium bifidum* PRL2010. *Anaerobe*, **21**, pp. 9-17.
- SHANAHAN, F., 2004. Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, **10 Suppl 1**, pp. S16-24.
- SHAPIRO, R.S., 2012. Improved IgG3 levels and reduced infection rate in a woman with CVID switched from intravenous to subcutaneous immunoglobulin therapy. *Immunotherapy*, **4**(12), pp. 1835-1839.
- SHARON, I. and BANFIELD, J.F., 2013. Microbiology. Genomes from metagenomics. *Science (New York, N.Y.)*, **342**(6162), pp. 1057-1058.
- SHARP, J.A., LEFEVRE, C., WATT, A. and NICHOLAS, K.R., 2016. Analysis of human breast milk cells: gene expression profiles during pregnancy, lactation, involution, and mastitic infection. *Functional & integrative genomics*, **16**(3), pp. 297-321.
- SHORTT, S.E., 1999. Waiting for medical care: is it who you know that counts? *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, **161**(7), pp. 823-824.
- SIERRA, C., BERNAL, M.J., BLASCO, J., MARTÍNEZ, R., DALMAU, J., ORTUNO,

- I., ESPÍN, B., VASALLO, M.I., GIL, D., VIDAL, M.L., INFANTE, D., LEIS, R., MALDONADO, J., MORENO, J.M. and ROMÁN, E., 2015. Prebiotic effect during the first year of life in healthy infants fed formula containing GOS as the only prebiotic: a multicentre, randomised, double-blind and placebo-controlled trial. *European journal of nutrition*, **54**(1), pp. 89-99.
- SIGGERS, R.H., SIGGERS, J., THYMAN, T., BOYE, M. and SANGILD, P.T., 2011. Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis. *The Journal of nutritional biochemistry*, **22**(6), pp. 511-521.
- SIM, K., POWELL, E., SHAW, A.G., MCCLURE, Z., BANGHAM, M. and KROLL, J.S., 2013. The neonatal gastrointestinal microbiota: the foundation of future health? *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, **98**(4), pp. F362-4.
- SIMON, G.L. and GORBACH, S.L., 1982. Intestinal microflora. *The Medical clinics of North America*, **66**(3), pp. 557-574.
- SIMSEK, Y., KARABIYIK, P., POLAT, K., DURAN, Z. and POLAT, A., 2015. Mode of delivery changes oxidative and antioxidative properties of human milk: a prospective controlled clinical investigation. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, **28**(6), pp. 734-738.
- SINGH, R., RAY, P., DAS, A. and SHARMA, M., 2010. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, **65**(9), pp. 1955-1958.
- SIPKA, A., KLAESSIG, S., DUHAMEL, G.E., SWINKELS, J., RAINARD, P. and SCHUKKEN, Y., 2014. Impact of intramammary treatment on gene expression profiles in bovine *Escherichia coli* mastitis. *PloS one*, **9**(1), pp. e85579.
- SMITH, D.M., Jr, PETERS, T.G. and DONEGAN, W.L., 1982. Montgomery's areolar tubercle. A light microscopic study. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, **106**(2), pp. 60-63.
- SMITH, K.M., EATON, A.D., FINLAYSON, L.M. and GARSIDE, P., 2000. Oral tolerance. *American journal of respiratory and critical care medicine*, **162**(4 Pt 2), pp. S175-8.
- SMYTH, D.S., HARTIGAN, P.J., MEANEY, W.J., FITZGERALD, J.R., DEOBALD, C.F., BOHACH, G.A. and SMYTH, C.J., 2005. Superantigen genes encoded by the *egc* cluster and SaPIbov are predominant among *Staphylococcus aureus* isolates from cows, goats, sheep, rabbits and poultry. *Journal of medical microbiology*, **54**(Pt 4), pp. 401-411.
- SNYDMAN, D.R., 2008. The safety of probiotics. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, **46 Suppl 2**, pp. S104-11; discussion S144-51.
- SOCIEDAD ESPAÑOLA DE PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS (SEPP), 2016. *Probióticos, prebióticos y salud: Evidencia científica*.
- SOLATI, S.M., TAJBAKHS, E., KHAMESIPOUR, F. and GUGNANI, H.C., 2015. Prevalence of virulence genes of biofilm producing strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from clinical samples in Iran. *AMB Express*, **5**(1), pp. 134-015-0134-3. Epub 2015 Aug 9.
- SOLÍS, G., DE LOS REYES-GAVILAN, C.G., FERNÁNDEZ, N., MARGOLLES, A. and GUEIMONDE, M., 2010. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*, **16**(3), pp. 307-310.
- SONG, J.W., YANG, S.J., SHIN, S., SEO, K.S., PARK, Y.H. and PARK, K.T., 2016. Genotypic and Phenotypic Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitic Milk in Korea. *Journal of food protection*, **79**(10), pp. 1725-1732.
- SORENSEN, L.P., GULDBRANDTSEN, B., THOMSEN, J.R. and LUND, M.S., 2008. Pathogen-specific effects of quantitative trait loci affecting clinical mastitis and somatic cell count in Danish Holstein cattle. *Journal of dairy science*, **91**(6), pp. 2493-2500.
- SOTO, A., MARTIN, V., JIMÉNEZ, E., MADER, I., RODRÍGUEZ, J.M. and FERNÁNDEZ, L., 2014. *Lactobacilli* and *bifidobacteria* in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **59**(1), pp. 78-88.

- SPINOSA, M.R., BRACCINI, T., RICCA, E., DE FELICE, M., MORELLI, L., POZZI, G. and OGGIONI, M.R., 2000. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Research in microbiology*, **151**(5), pp. 361-368.
- SPREADBURY, I., 2012. Comparison with ancestral diets suggests dense acellular carbohydrates promote an inflammatory microbiota, and may be the primary dietary cause of leptin resistance and obesity. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, **5**, pp. 175-189.
- SPRENGER, N., LEE, L.Y., DE CASTRO, C.A., STEENHOUT, P. and THAKKAR, S.K., 2017. Longitudinal change of selected human milk oligosaccharides and association to infants' growth, an observatory, single center, longitudinal cohort study. *PloS one*, **12**(2), pp. e0171814.
- STACH, C.S., VU, B.G. and SCHLIEVERT, P.M., 2015. Determining the Presence of Superantigens in Coagulase Negative *Staphylococci* from Humans. *PloS one*, **10**(11), pp. e0143341.
- STAM, J., SAUER, P.J. and BOEHM, G., 2013. Can we define an infant's need from the composition of human milk? *The American Journal of Clinical Nutrition*, **98**(2), pp. 521S-8S.
- STAPELS, D.A., KUIPERS, A., VON KOCKRITZ-BLICKWEDE, M., RUYKEN, M., TROMP, A.T., HORSBURGH, M.J., DE HAAS, C.J., VAN STRIJP, J.A., VAN KESSEL, K.P. and ROOIJAKKERS, S.H., 2016. *Staphylococcus aureus* protects its immune-evasion proteins against degradation by neutrophil serine proteases. *Cellular microbiology*, **18**(4), pp. 536-545.
- STAPLETON, N.M., ANDERSEN, J.T., STEMERDING, A.M., BJARNARSON, S.P., VERHEUL, R.C., GERRITSEN, J., ZHAO, Y., KLEIJER, M., SANDLIE, I., DE HAAS, M., JONSDOTTIR, I., VAN DER SCHOOT, C.E. and VIDARSSON, G., 2011. Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential. *Nature communications*, **2**, pp. 599.
- STAVNEZER, J., 1995. Regulation of antibody production and class switching by TGF-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **155**(4), pp. 1647-1651.
- STELWAGEN, K. and SINGH, K., 2014. The role of tight junctions in mammary gland function. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, **19**(1), pp. 131-138.
- STENSALLE, L.G., SIMONSEN, J., JENSEN, S.M., BONNELYKKE, K. and BISGAARD, H., 2013. Use of antibiotics during pregnancy increases the risk of asthma in early childhood. *The Journal of pediatrics*, **162**(4), pp. 832-838.e3.
- STOCKINGER, S., HORNEF, M.W. and CHASSIN, C., 2011. Establishment of intestinal homeostasis during the neonatal period. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, **68**(22), pp. 3699-3712.
- STRAKA, M., 2011. Pregnancy and periodontal tissues. *Neuro endocrinology letters*, **32**(1), pp. 34-38.
- SU, L.L., S, K.T.C., LIM, S.L., CHEN, Y., TAN, E.A., PAI, N.N., GONG, Y.H., FOO, J., RAUFF, M. and CHONG, Y.S., 2010. The influence of maternal ethnic group and diet on breast milk fatty acid composition. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*, **39**(9), pp. 675-675.
- SUN, J., ASWATH, K., SCHROEDER, S.G., LIPPOLIS, J.D., REINHARDT, T.A. and SONSTEGARD, T.S., 2015. MicroRNA expression profiles of bovine milk exosomes in response to *Staphylococcus aureus* infection. *BMC genomics*, **16**, pp. 806-015-2044-9.
- SUNG, V., CABANA, M.D., D'AMICO, F., DESHPANDE, G., DUPONT, C., INDRIO, F., MENTULA, S., PARTTY, A., SAVINO, F., SZAJEWSKA, H. and TANCREDI, D., 2014. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for managing infant colic: protocol for an individual participant data meta-analysis. *BMJ open*, **4**(12), pp. e006475-2014-006475.
- SUZUKI, K., HA, S.A., TSUJI, M. and FAGARASAN, S., 2007. Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Seminars in immunology*, **19**(2), pp. 127-135.
- SWANSON, K.M., STELWAGEN, K., DOBSON, J., HENDERSON, H.V., DAVIS, S.R., FARR, V.C. and SINGH, K., 2009. Transcriptome profiling of *Streptococcus uberis*-induced mastitis reveals fundamental differences between immune gene expression in the mammary gland and in a primary cell culture model. *Journal of dairy science*, **92**(1), pp. 117-129.

- SWIATCZAK, B. and RESCIGNO, M., 2012. How the interplay between antigen presenting cells and microbiota tunes host immune responses in the gut. *Seminars in immunology*, **24**(1), pp. 43-49.
- SWIDEREK, W.P., BHIIDE, M.R., GRUSZCZYNSKA, J., SOLTIS, K., WITKOWSKA, D. and MIKULA, I., 2006. Toll-like receptor gene polymorphism and its relationship with somatic cell concentration and natural bacterial infections of the mammary gland in sheep. *Folia microbiologica*, **51**(6), pp. 647-652.
- SZAJEWSKA, H., GYRCZUK, E. and HORVATH, A., 2013. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 for the management of infantile colic in breastfed infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The Journal of pediatrics*, **162**(2), pp. 257-262.
- TAKAHASHI, H., MIKAMI, K., NISHINO, R., MATSUOKA, T., KIMURA, M. and KOGA, Y., 2010. Comparative analysis of the properties of bifidobacterial isolates from fecal samples of mother-infant pairs. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **51**(5), pp. 653-660.
- TAKAHASHI, K., TERASHIMA, H., KOHNO, K. and OHKOHCHI, N., 2013. A stand-alone symbiotic treatment for the prevention of D-lactic acidosis in short bowel syndrome. *International surgery*, **98**(2), pp. 110-113.
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K. and AKIRA, S., 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **165**(10), pp. 5392-5396.
- TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., KAWAI, T., SANJO, H., TAKADA, H., OGAWA, T., TAKEDA, K. and AKIRA, S., 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, **11**(4), pp. 443-451.
- TANNOCK, G.W., 1995. More than smell: the complexity of the normal microflora. In: CHAPMAN AND HALL, ed, *Normal microflora. An introduction to microbes inhabiting the human body*. Londres: pp. 1-35.
- TEZER, M., OZLUK, Y., SANLI, O., ASOGLU, O. and KADIOGLU, A., 2012. Nitric oxide may mediate nipple erection. *Journal of andrology*, **33**(5), pp. 805-810.
- THIBODEAU, J., CLOUTIER, I., LAVOIE, P.M., LABRECQUE, N., MOURAD, W., JARDETZKY, T. and SEKALY, R.P., 1994. Subsets of HLA-DR1 molecules defined by SEB and TSST-1 binding. *Science (New York, N.Y.)*, **266**(5192), pp. 1874-1878.
- THOMSEN, A.C., MOGENSEN, S.C. and LOVE JEPSEN, F., 1985. Experimental mastitis in mice induced by coagulase-negative *staphylococci* isolated from cases of mastitis in nursing women. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, **64**(2), pp. 163-166.
- THONGARAM, T., HOEFLINGER, J.L., CHOW, J. and MILLER, M.J., 2017. Human milk oligosaccharide consumption by probiotic and human-associated bifidobacteria and lactobacilli. *Journal of dairy science*, **100**(10), pp. 7825-7833.
- THORBERG, B.M., DANIELSSON-THAM, M.L., EMANUELSON, U. and PERSSON WALLER, K., 2009. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative *staphylococci*. *Journal of dairy science*, **92**(10), pp. 4962-4970.
- THURL, S., MUNZERT, M., HENKER, J., BOEHM, G., MULLER-WERNER, B., JELINEK, J. and STAHL, B., 2010. Variation of human milk oligosaccharides in relation to milk groups and lactational periods. *The British journal of nutrition*, **104**(9), pp. 1261-1271.
- TIAN, Y., LI, Y., HU, Z., WANG, D., SUN, X. and REN, C., 2010. Differential effects of NOD2 polymorphisms on colorectal cancer risk: a meta-analysis. *International journal of colorectal disease*, **25**(2), pp. 161-168.
- TISSIER, H., 1907. *Traitement des infections intestinales par la methode de transformation de la flore bacterienne de l'intestin*.
- TORTORA, G.J. and DERRICKSON, B., 2013. *Principios de Anatomía y Fisiología*. 13 edn. Editorial Médica Panamericana.
- TROIS, L., CARDOSO, E.M. and MIURA, E., 2008. Use of probiotics in HIV-infected children: a randomized double-blind controlled study. *Journal of tropical pediatrics*, **54**(1), pp. 19-24.
- TROXELL, M.L., GORDON, N.T., DOGETT, J.S., BALLARD, M., VETTO, J.T., POMMIER, R.F. and NAIK, A.M., 2016. Cystic Neutrophilic Granulomatous Mastitis: Association With Gram-Positive Bacilli and

- Corynebacterium. *American Journal of Clinical Pathology*, **145**(5), pp. 635-645.
- TU, Q., HE, Z., LI, Y., CHEN, Y., DENG, Y., LIN, L., HEMME, C.L., YUAN, T., VAN NOSTRAND, J.D., WU, L., ZHOU, X., SHI, W., LI, L., XU, J. and ZHOU, J., 2014. Development of HuMiChip for functional profiling of human microbiomes. *PloS one*, **9**(3), pp. e90546.
- TUNDUP, S., SRIVASTAVA, L., NORBERG, T., WATFORD, W. and HARN, D., 2015. A Neoglycoconjugate Containing the Human Milk Sugar LNFPIII Drives Anti-Inflammatory Activation of Antigen Presenting Cells in a CD14 Dependent Pathway. *PloS one*, **10**(9), pp. e0137495.
- TURNBAUGH, P.J. and GORDON, J.I., 2009. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of physiology*, **587**(Pt 17), pp. 4153-4158.
- TURNBAUGH, P.J., LEY, R.E., MAHOWALD, M.A., MAGRINI, V., MARDIS, E.R. and GORDON, J.I., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, **444**(7122), pp. 1027-1031.
- TURPIN, W., ESPIN-GARCIA, O., XU, W., SILVERBERG, M.S., KEVANS, D., SMITH, M.I., GUTTMAN, D.S., GRIFFITHS, A., PANACCIONE, R., OTLEY, A., XU, L., SHESTOPALOFF, K., MORENO-HAGELSIEB, G., GEM PROJECT RESEARCH CONSORTIUM, PATERSON, A.D. and CROITORU, K., 2016. Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort. *Nature genetics*, **48**(11), pp. 1413-1417.
- UNDERWOOD, M.A., 2013. Human milk for the premature infant. *Pediatric clinics of North America*, **60**(1), pp. 189-207.
- UNDERWOOD, M.A., GERMAN, J.B., LEBRILLA, C.B. and MILLS, D.A., 2015. *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis*: champion colonizer of the infant gut. *Pediatric research*, **77**(1-2), pp. 229-235.
- URBANIYAK, C., CUMMINS, J., BRACKSTONE, M., MACKLAIM, J.M., GLOOR, G.B., BABAN, C.K., SCOTT, L., O'HANLON, D.M., BURTON, J.P., FRANCIS, K.P., TANGNEY, M. and REID, G., 2014. Microbiota of human breast tissue. *Applied and Environmental Microbiology*, **80**(10), pp. 3007-3014.
- URBANIYAK, C., MCMILLAN, A., ANGELINI, M., GLOOR, G.B., SUMARAH, M., BURTON, J.P. and REID, G., 2014. Effect of chemotherapy on the microbiota and metabolome of human milk, a case report. *Microbiome*, **2**, pp. 24-2618-2-24. eCollection 2014.
- URIBARRI, J., OH, M.S. and CARROLL, H.J., 1998. D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathophysiologic mechanisms. *Medicine*, **77**(2), pp. 73-82.
- URUSHIYAMA, D., SUDA, W., OHNISHI, E., ARAKI, R., KIYOSHIMA, C., KURAKAZU, M., SANUI, A., YOTSUMOTO, F., MURATA, M., NABESHIMA, K., YASUNAGA, S., SAITO, S., NOMIYAMA, M., HATTORI, M., MIYAMOTO, S. and HATA, K., 2017. Microbiome profile of the amniotic fluid as a predictive biomarker of perinatal outcome. *Scientific reports*, **7**(1), pp. 12171-017-11699-8.
- VAEL, C. and DESAGER, K., 2009. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Current opinion in pediatrics*, **21**(6), pp. 794-800.
- VAN DE VEN, A.A., JANSSEN, W.J., SCHULZ, L.S., VAN LOON, A.M., VOORKAMP, K., SANDERS, E.A., KUSTERS, J.G., NIERKENS, S., BOES, M., WENSING, A.M. and VAN MONTFRANS, J.M., 2014. Increased prevalence of gastrointestinal viruses and diminished secretory immunoglobulin a levels in antibody deficiencies. *Journal of clinical immunology*, **34**(8), pp. 962-970.
- VAN DEN OEVER, H.L., VERSTEEGH, F.G., THEWESSEN, E.A., VAN DEN ANKER, J.N., MOUTON, J.W. and NEIJENS, H.J., 1998. Ciprofloxacin in preterm neonates: case report and review of the literature. *European journal of pediatrics*, **157**(10), pp. 843-845.
- VAN NOOD, E., VRIEZE, A., NIEUWDORP, M., FUENTES, S., ZOETENDAL, E.G., DE VOS, W.M., VISSER, C.E., KUIJPER, E.J., BARTELSMAN, J.F., TIJSSEN, J.G., SPEELMAN, P., DIJKGRAAF, M.G. and KELLER, J.J., 2013. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England journal of medicine*, **368**(5), pp. 407-415.
- VAN PELT, C., NOUWEN, J., LUGTENBURG, E., VAN DER SCHEE, C., DE MARIE, S., SCHUIJFF, P., VERBRUGH, H.,



- LOWENBERG, B., VAN BELKUM, A. and VOS, M., 2003. Strict infection control measures do not prevent clonal spread of coagulase negative *staphylococci* colonizing central venous catheters in neutropenic hemato-oncologic patients. *FEMS immunology and medical microbiology*, **38**(2), pp. 153-158.
- VAN REENEN, C.A. and DICKS, L.M., 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology*, **193**(3), pp. 157-168.
- VANKERCKHOVEN, V., VAN AUTGAERDEN, T., HUYS, G., VANCANNEYT, M., SWINGS, J. and GOOSSENS, H., 2004. Establishment of the PROSAFE collection of probiotic and human lactic acid bacteria. *Microbial Ecology in Health and Disease*, **26**(131), pp. 6.
- VÁZQUEZ-FRESNO, R., LLORACH, R., MARINIC, J., TULIPANI, S., GARCÍA-ALOY, M., ESPINOSA-MARTOS, I., JIMÉNEZ, E., RODRÍGUEZ, J.M. and ANDRÉS-LACUEVA, C., 2014. Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis. *Pharmacological research*, **87**, pp. 160-165.
- VÁZQUEZ-TORRES, A., JONES-CARSON, J., BAUMLER, A.J., FALKOW, S., VALDIVIA, R., BROWN, W., LE, M., BERGGREN, R., PARKS, W.T. and FANG, F.C., 1999. Extraintestinal dissemination of *Salmonella* by CD18-expressing phagocytes. *Nature*, **401**(6755), pp. 804-808.
- VELDHOEN, M., HOCKING, R.J., ATKINS, C.J., LOCKSLEY, R.M. and STOCKINGER, B., 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, **24**(2), pp. 179-189.
- VERHASSELT, V., 2010. Oral tolerance in neonates: from basics to potential prevention of allergic disease. *Mucosal immunology*, **3**(4), pp. 326-333.
- VESTERLUND, S., VANKERCKHOVEN, V., SAXELIN, M., GOOSSENS, H., SALMINEN, S. and OUWEHAND, A.C., 2007. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *International journal of food microbiology*, **116**(3), pp. 325-331.
- VIDANARACHCHI, J.K., LI, S., LUNDH, A.S. and JOHANSSON, M., 2015. Short communication: Lipolytic activity on milk fat by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* strains commonly isolated in Swedish dairy herds. *Journal of dairy science*, **98**(12), pp. 8560-8564.
- VITALI, B., CRUCIANI, F., BALDASSARRE, M.E., CAPURSI, T., SPISNI, E., VALERII, M.C., CANDELA, M., TURRONI, S. and BRIGIDI, P., 2012. Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC microbiology*, **12**, pp. 236-2180-12-236.
- VITETTA, L., COULSON, S., THOMSEN, M., NGUYEN, T. and HALL, S., 2017. Probiotics, D-Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity. *Gut microbes*, **8**(4), pp. 311-322.
- VOGT, S.L., PENA-DIAZ, J. and FINLAY, B.B., 2015. Chemical communication in the gut: Effects of microbiota-generated metabolites on gastrointestinal bacterial pathogens. *Anaerobe*, **34**, pp. 106-115.
- VON BERNUTH, H., PICARD, C., JIN, Z., PANKLA, R., XIAO, H., KU, C.L., CHRABIEH, M., MUSTAPHA, I.B., GHANDIL, P., CAMCIOGLU, Y., VASCONCELOS, J., SIRVENT, N., GUEDES, M., VITOR, A.B., HERREROMATA, M.J., AROSTEGUI, J.I., RODRIGO, C., ALSINA, L., RUIZ-ORTIZ, E., JUAN, M., FORTUNY, C., YAGUE, J., ANTÓN, J., PASCAL, M., CHANG, H.H., JANNIERE, L., ROSE, Y., GARTY, B.Z., CHAPEL, H., ISSEKUTZ, A., MARODI, L., RODRIGUEZ-GALLEGO, C., BANCHEREAU, J., ABEL, L., LI, X., CHAUSSABEL, D., PUEL, A. and CASANOVA, J.L., 2008. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science (New York, N.Y.)*, **321**(5889), pp. 691-696.
- VOS, M.C., OTT, A. and VERBRUGH, H.A., 2005. Successful search-and-destroy policy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in The Netherlands. *Journal of clinical microbiology*, **43**(4), pp. 2034; author reply 2034-5.
- WALKER, M., 2008. Conquering common breast-feeding problems. *The Journal of perinatal & neonatal nursing*, **22**(4), pp. 267-274.
- WANG, J., RODERIQUEZ, G. and NORCROSS, M.A., 2012. Control of adaptive immune responses by *Staphylococcus aureus* through

- IL-10, PD-L1, and TLR2. *Scientific reports*, **2**, pp. 606.
- WANG, X., LEUNG, A.W., HUA, H., XU, C. and IP, M., 2015. Sonodynamic action of hypocrellin B on biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* in planktonic condition. *The Journal of the Acoustical Society of America*, **138**(4), pp. 2548-2553.
- WANG, X., XU, S., GAO, X., REN, H. and CHEN, J., 2007. Genetic polymorphism of TLR4 gene and correlation with mastitis in cattle. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, **34**(5), pp. 406-412.
- WARD, T.L., HOSID, S., IOSHIKHES, I. and ALTOSAAR, I., 2013. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC microbiology*, **13**, pp. 116-2180-13-116.
- WARINNER, C., SPELLER, C., COLLINS, M.J. and LEWIS, C.M., Jr, 2015. Ancient human microbiomes. *Journal of human evolution*, **79**, pp. 125-136.
- WEEMS, M.F., DEREDDY, N.R. and ARNOLD, S.R., 2015. Mother's Milk as a Source of Enterobacter cloacae Sepsis in a Preterm Infant. *Breastfeeding medicine: the official journal of the Academy of Breastfeeding Medicine*, **10**(10), pp. 503-504.
- WEIZMAN, Z. and ALSHEIKH, A., 2006. Safety and tolerance of a probiotic formula in early infancy comparing two probiotic agents: a pilot study. *Journal of the American College of Nutrition*, **25**(5), pp. 415-419.
- WELLNITZ, O. and BRUCKMAIER, R.M., 2012. The innate immune response of the bovine mammary gland to bacterial infection. *Veterinary journal (London, England: 1997)*, **192**(2), pp. 148-152.
- WENG, M. and WALKER, W.A., 2013. The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of developmental origins of health and disease*, **4**(3), pp. 203-214.
- WHITE, R.A., BJORNHOLT, J.V., BAIRD, D.D., MIDTVEDT, T., HARRIS, J.R., PAGANO, M., HIDE, W., RUDI, K., MOEN, B., ISZATT, N., PEDDADA, S.D. and EGGESBO, M., 2013. Novel developmental analyses identify longitudinal patterns of early gut microbiota that affect infant growth. *PLoS computational biology*, **9**(5), pp. e1003042.
- WICKRAMASINGHE, S., PACHECO, A.R., LEMAY, D.G. and MILLS, D.A., 2015. *Bifidobacteria* grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC microbiology*, **15**, pp. 172-015-0508-3.
- WILLIAMS, J.E., CARROTHERS, J.M., LACKEY, K.A., BEATTY, N.F., YORK, M.A., BROOKER, S.L., SHAFII, B., PRICE, W.J., SETTLES, M.L., MCGUIRE, M.A. and MCGUIRE, M.K., 2017. Human Milk Microbial Community Structure Is Relatively Stable and Related to Variations in Macronutrient and Micronutrient Intakes in Healthy Lactating Women. *The Journal of nutrition*, **147**(9), pp. 1739-1748.
- WILLIAMS, J.E., PRICE, W.J., SHAFII, B., YAHVAH, K.M., BODE, L., MCGUIRE, M.A. and MCGUIRE, M.K., 2017. Relationships Among Microbial Communities, Maternal Cells, Oligosaccharides, and Macronutrients in Human Milk. *Journal of human lactation: official journal of International Lactation Consultant Association*, **33**(3), pp. 540-551.
- WILLIAMSON, S., FINUCANE, E., GAMSU, H.R. and HEWITT, J.H., 1978. Staphylococcus aureus in raw human milk for neonates. *British medical journal*, **1**(6120), pp. 1146.
- WILLING, B.P., RUSSELL, S.L. and FINLAY, B.B., 2011. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature reviews. Microbiology*, **9**(4), pp. 233-243.
- WINE, E., GAREAU, M.G., JOHNSON-HENRY, K. and SHERMAN, P.M., 2009. Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. *FEMS microbiology letters*, **300**(1), pp. 146-152.
- WITKOWSKA-ZIMNY, M. and KAMINSKA-EL-HASSAN, E., 2017. Cells of human breast milk. *Cellular & Molecular Biology Letters*, **22**, pp. 11-017-0042-4. eCollection 2017.
- WOLF, C., KUSCH, H., MONECKE, S., ALBRECHT, D., HOLTRETER, S., VON EIFF, C., PETZL, W., RAINARD, P., BROKER, B.M. and ENGELMANN, S., 2011. Genomic and proteomic characterization of *Staphylococcus aureus* mastitis isolates of bovine origin. *Proteomics*, **11**(12), pp. 2491-2502.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. 2014.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) and DEPARTMENT OF CHILD AND ADOLESCENT HEALTH AND DEVELOPMENT, 2000. *Mastitis: Causes and Management*. Geneva, Switzerland. WHO reference No. WHO/FCH/CAH/ 00.13.
- WU, B.B., YANG, Y., XU, X. and WANG, W.P., 2016. Effects of *Bifidobacterium* supplementation on intestinal microbiota composition and the immune response in healthy infants. *World journal of pediatrics: WJP*, **12**(2), pp. 177-182.
- XIA, G. and WOLZ, C., 2014. Phages of *Staphylococcus aureus* and their impact on host evolution. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, **21**, pp. 593-601.
- XU, A.J., LIU, X.L., GUO, J.Z. and XIA, Z., 2010. Polymorphism of bovine TNF- $\alpha$  gene and its association with mastitis in Chinese Holstein cows. *Yi chuan = Hereditas*, **32**(9), pp. 929-934.
- YAHVAH, K.M., BROOKER, S.L., WILLIAMS, J.E., SETTLES, M., MCGUIRE, M.A. and MCGUIRE, M.K., 2015. Elevated dairy fat intake in lactating women alters milk lipid and fatty acids without detectible changes in expression of genes related to lipid uptake or synthesis. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, **35**(3), pp. 221-228.
- YAMAZAKI, S., MACHII, K., TSUYUKI, S., MOMOSE, H., KAWASHIMA, T. and UEDA, K., 1985. Immunological responses to monoassociated *Bifidobacterium longum* and their relation to prevention of bacterial invasion. *Immunology*, **56**(1), pp. 43-50.
- YANG, S., LI, W., CHALLIS, J.R., REID, G., KIM, S.O. and BOCKING, A.D., 2014. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 supernatant prevents lipopolysaccharide-induced preterm birth and reduces inflammation in pregnant CD-1 mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **211**(1), pp. 44.e1-44.e12.
- YAO, Y., STURDEVANT, D.E. and OTTO, M., 2005. Genomewide analysis of gene expression in *Staphylococcus epidermidis* biofilms: insights into the pathophysiology of *S. epidermidis* biofilms and the role of phenol-soluble modulins in formation of biofilms. *The Journal of infectious diseases*, **191**(2), pp. 289-298.
- YARANDI, S.S., PETERSON, D.A., TREISMAN, G.J., MORAN, T.H. and PASRICHA, P.J., 2016. Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases. *Journal of neurogastroenterology and motility*, **22**(2), pp. 201-212.
- YATSUNENKO, T., REY, F.E., MANARY, M.J., TREHAN, I., DOMÍNGUEZ-BELLO, M.G., CONTRERAS, M., MAGRIS, M., HIDALGO, G., BALDASSANO, R.N., ANOKHIN, A.P., HEATH, A.C., WARNER, B., REEDER, J., KUCZYNSKI, J., CAPORASO, J.G., LOZUPONE, C.A., LAUBER, C., CLEMENTE, J.C., KNIGHTS, D., KNIGHT, R. and GORDON, J.I., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, **486**(7402), pp. 222-227.
- YU, H.J., DENG, H., MA, J., HUANG, S.J., YANG, J.M., HUANG, Y.F., MU, X.P., ZHANG, L. and WANG, Q., 2016. Clinical metagenomic analysis of bacterial communities in breast abscesses of granulomatous mastitis. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, **53**, pp. 30-33.
- YU, W., KIM, H.K., RAUCH, S., SCHNEEWIND, O. and MISSIAKAS, D., 2017. Pathogenic conversion of coagulase-negative staphylococci. *Microbes and Infection*, **19**(2), pp. 101-109.
- YU, Y.A., SHABAHANG, S., TIMIRYASOVA, T.M., ZHANG, Q., BELTZ, R., GENTSCHKEV, I., GOEBEL, W. and SZALAY, A.A., 2004. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nature biotechnology*, **22**(3), pp. 313-320.
- ZHANG, S. and MADDOX, C.W., 2000. Cytotoxic activity of coagulase-negative staphylococci in bovine mastitis. *Infection and immunity*, **68**(3), pp. 1102-1108.
- ZHAO, M., YANG, M., LI, X.M., JIANG, P., BARANOV, E., LI, S., XU, M., PENMAN, S. and HOFFMAN, R.M., 2005. Tumor-targeting bacterial therapy with amino acid auxotrophs of GFP-expressing *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**(3), pp. 755-760.

- ZHAO, M., YANG, M., MA, H., LI, X., TAN, X., LI, S., YANG, Z. and HOFFMAN, R.M., 2006. Targeted therapy with a *Salmonella typhimurium* leucine-arginine auxotroph cures orthotopic human breast tumors in nude mice. *Cancer research*, **66**(15), pp. 7647-7652.
- ZIMMERMANN, P., GWEE, A. and CURTIS, N., 2017. The controversial role of breast milk in GBS late-onset disease. *The Journal of infection*, **74 Suppl 1**, pp. S34-S40.
- ZOETENDAL, E.G., AKKERMANS, A.D. and DE VOS, W.M., 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(10), pp. 3854-3859.
- ZOETENDAL, E.G., VON WRIGHT, A., VILPPONEN-SALMELA, T., BEN-AMOR, K., AKKERMANS, A.D. and DE VOS, W.M., 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(7), pp. 3401-3407.

